



HAL
open science

Amélioration de la tolérance de la radiothérapie par une approche individuelle radiobiologique et une démarche conceptuelle unifiée en hadronthérapie

Guillaume Vogin

► To cite this version:

Guillaume Vogin. Amélioration de la tolérance de la radiothérapie par une approche individuelle radiobiologique et une démarche conceptuelle unifiée en hadronthérapie. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. NNT : 2014LYO10218 . tel-01127175

HAL Id: tel-01127175

<https://theses.hal.science/tel-01127175>

Submitted on 7 Mar 2015

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

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

N° d'ordre 218-2014

Année 2014

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON
Délivrée par
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON 1

École Doctorale Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire

DIPLOME DE DOCTORAT
SCIENCES DE LA VIE
(Arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 10 octobre 2014
par
Guillaume VOGIN

**Amélioration de la tolérance de la radiothérapie par
une approche individuelle radiobiologique et une
démarche conceptuelle unifiée en hadronthérapie.**

Composition du jury :

Pr Didier PEIFFERT
Pr Marco KRENGLI
Dr Jean-Pierre POUGET
Pr Jean-Yves BLAY
Pr Pierre VERRELLE
Dr Nicolas FORAY
Pr Jacques BALOSSO

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Membre invité
Directeur de thèse
Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

- | | |
|---|---|
| - Vice-président du Conseil d'Administration | M. François-Noël GILLY
M. le Professeur Hamda BEN HADID |
| - Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire | M. le Professeur Philippe LALLE |
| - Vice-président du Conseil Scientifique | M. le Professeur Germain GILLET |
| - Directeur Général des Services | M. Alain HELLEU |

COMPOSANTES SANTE

- | | |
|---|---|
| - Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard | Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE |
| - Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux | Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON |
| - Faculté d'Odontologie | Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS |
| - Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques | Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA |
| - Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation | Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON |
| - Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine | Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT |

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

- | | |
|---|---|
| - Faculté des Sciences et Technologies | Directeur : M. F. DE MARCHI |
| - Département Biologie | Directeur : M. le Professeur F. FLEURY |
| - Département Chimie Biochimie | Directeur : Mme Caroline FELIX |
| - Département GEP | Directeur : M. Hassan HAMMOURI |
| - Département Informatique | Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE |
| - Département Mathématiques | Directeur : M. Georges TOMANOV |
| - Département Mécanique | Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID |
| - Département Physique | Directeur : M. Jean-Claude PLENET |
| - UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives | Directeur : M. Y.VANPOULLE |
| - Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon | Directeur : M. B. GUIDERDONI |
| - Polytech Lyon | Directeur : M. P. FOURNIER |
| - Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique | Directeur : M. G. PIGNAULT |
| - Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1 | Directeur : M. C. VITON |
| - Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education | Directeur : M. A. MOUGNIOTTE |
| - Institut de Science Financière et d'Assurances | Directeur : M. N. LEBOISNE |

Résumé

Amélioration de la tolérance de la radiothérapie par une approche individuelle radiobiologique et une démarche conceptuelle unifiée en hadronthérapie.

Contexte général. Chaque année 175 000 patients sont traités par radiothérapie (RT) en France. Elle participe à environ 50 % des guérisons. 60% des adultes et 80% des enfants et adolescents traités pour cancer, tous stades confondus guérissent de sorte que les oncologues ont à suivre davantage de longs survivants. La qualité de la (sur)vie est un indicateur de plus en plus utilisé. En effet puisqu'il s'avère nécessaire d'inclure une marge de tissus sains autour des volumes cibles au-delà de la tumeur visible d'une part, et du fait des propriétés physiques des photons d'autre part, presque tous les patients traités par RT conformationnelle sont exposés à une toxicité précoce dont 10 à 15% à un niveau important considéré comme « inhabituel » par un radiothérapeute expérimenté ; 3 à 5% des adultes subissent une toxicité tardive pouvant entraîner des séquelles parfois graves. En oncopédiatrie en particulier, l'incidence des séquelles au moins 30 ans après le diagnostic de cancer atteint une incidence cumulative de 73,4%. Les techniques innovantes de photonothérapie apportent une solution balistique pertinente mais inappropriée pour les 10 à 12% de tumeurs se trouvant soit en contact intime avec des tissus sains particulièrement sensibles, ou très radiorésistantes excédant de loin la tolérance des tissus voisins ou encore pour les patients présentant une radiosensibilité individuelle excessive.

Deux approches développées dans nos équipes d'accueil permettent d'entrevoir des solutions à ces situations.

1- Contribution au développement de l'hadronthérapie par ions carbone

Problématique. Les ions carbone sont des particules possédant une masse et une charge qui leur confère un avantage balistique et biologique particulièrement intéressant pour certaines tumeurs inopérables et très radiorésistantes qui constituent actuellement de véritables impasses thérapeutiques. Le caractère rare des tumeurs éligibles et le très faible nombre de centres n'ont pas permis, ou justifié, à ce jour la réalisation d'études classiques de comparaisons randomisées afin d'évaluer le service rendu de cette thérapie couteuse.

Objectifs. Ces études qui apparaissent nécessaires doivent faire appel à une collaboration entre les différents centres de traitement. Cette mise en commun des données supposées comparables repose sur une homogénéisation des pratiques, la définition de concepts dose-volumes adaptés et une modélisation biologique plus complète.

Méthodologie. Dans le cadre du programme FP7 ULICE, nous avons intégré et animé plusieurs groupes à l'échelle nationale (chercheurs et cliniciens impliqués dans le Programme Régional de Recherche en Hadronthérapie) et international. Nous devons fournir des livrables-clés selon un calendrier imposé par la Commission Européenne (CE). Nous avons été particulièrement impliqués dans les WP 2, 7, 9, 10 et 11. Les livrables ont fait l'objet de discussions consensuelles basées sur des rapports d'experts, des réunions de travail en groupes thématiques, ou l'élaboration de questionnaires soumis à la communauté médico-scientifique. Les livrables étaient ensuite validés par le coordonnateur du WP puis du pilier et enfin du projet avant soumission à la CE.

Résultats. Nous avons directement participé à la production de procédures unifiées en terme d'immobilisation, de recueil des données élémentaires, de structuration protocolaire et de transformation des données en métadonnées échangeables. En l'absence de recommandations spécifiques de l'ICRU, nous avons proposé des concepts originaux permettant de décrire la dose prescrite et les volumes d'intérêt, au-delà du concept réducteur d'EBR .

Perspectives. L'ensemble des résultats apportés tendent à harmoniser les pratiques de la carbonothérapie, pré requis nécessaire aux études de phase III réclamées par les décideurs. Toutefois certaines limites se présentent : insuffisance des modèles et des données biologiques concernant en particulier les tissus sains, faible disponibilité des plateaux de radiobiologie dédiés. Le CERN prévoit en ce sens de mettre à disposition des chercheurs une ligne de faisceau (LEIR).

2- Un nouveau biomarqueur de radiosensibilité individuelle

Problématique. L'identification des patients les plus à risque de développer les réactions les plus sévères reste un enjeu majeur de la radiothérapie moderne, pourtant soulevé il y a plus d'un siècle. Avec l'amélioration des connaissances moléculaires de la signalisation des dommages radio induits

de l'ADN, de nombreux tests de radiosensibilité individuelle se sont développés. Aucun n'a obtenu le statut de gold standard à ce jour.

A partir de primocultures fibroblastiques issues de patients ayant présenté une maladie génétique conférant une hyper radiosensibilité ou un profil de toxicité inhabituel à la RT, le taux de cassures double brins (CDB) non réparées à 24h estimé par immunofluorescence indirecte (IFI, marqueur γ H2AX) a permis de définir 3 groupes de RS. Toutefois ce seul marqueur ne permet pas d'obtenir de corrélation suffisamment robuste avec la sévérité des toxicités.

Objectifs. En observant certaines lignées de patients hyper radiosensibles ne présentant pas de déficit de réparation des CDB, il nous est apparu que certaines protéines cytoplasmiques défectueuses pouvaient être associées au phénotype radiosensible; ce dernier pouvant être restauré grâce aux inhibiteurs de farnesyl transférase. Notre intérêt s'est porté sur l'identification d'un nouveau biomarqueur de RS à partir de ces observations.

Méthodologie. Nous avons enrichi la collection de primocultures fibroblastiques issues de patients ayant déclaré une toxicité inhabituel à la RT (étude COPERNIC) et réalisé des tests d'IFI avec des marqueurs supplémentaires. Chaque nouvelle protéine d'intérêt était quantifiée en western blot sur un panel de lignées de la collection. En parallèle, les biomarqueurs validés dans le laboratoire devant l'être également cliniquement, nous avons développé une étude prospective, nationale et multicentrique, de validation du test dans une population pédiatrique (étude ARPEGE). Les variations inter tissulaires du biomarqueur d'intérêt ont enfin été étudiées au cours d'un essai prospectif monocentrique préliminaire (étude PREVIRAS).

Résultats. Ce travail nous a permis d'authentifier que les foci pATM sont très informatifs et suggèrent un transit cyto-nucléaire de la protéine après irradiation. Ce transit peut être altéré par des protéines substrats mutées dans les syndromes non associées avec un déficit de réparation des CDB. Le délai de transit cyto-nucléaire de la protéine ATM semble affiner notre classification de la RS humaine. Conjugué au marqueur γ H2AX, ce nouveau biomarqueur semble prédictif de la sévérité de la toxicité précoce et tardive à la RT. Un nouveau modèle mécanistique a ainsi pu être développé.

Perspectives. La spécificité tissulaire de ce nouveau biomarqueur de RS individuelle a été testée prospectivement dans une population de patientes traitées pour cancer du sein dans notre institution. L'analyse des résultats est en cours. L'étude ARPEGE a été totalement financée et débutera fin 2014. Cette étape indispensable permettra d'entrevoir un développement ultérieur de ce test pour une caractérisation systématique des patients ayant besoin d'une RT afin de personnaliser la prescription du traitement. La mise en place de tests de radiosensibilité individuelle permettrait ainsi de créer une nouvelle ligne de défense dans le domaine particulier de la prévention des risques de la RT.

Conclusion générale. Les concepts fondamentaux développés dans l'équipe d'accueil peuvent intéresser la communauté dans la modélisation harmonisée de la dose biologique reçue par les tissus sains, soumis à une hadronthérapie. En effet, ULICE a globalement délaissé la problématique des tissus sains irradiés à EBR élevée. Les ratios $\alpha/\beta_{\text{tissus sains}}$ sont certainement à redéfinir dans ce type d'approche à condition d'utiliser des modèles expérimentaux pertinents. Le nouveau modèle de nucléarisation de pATM permettra certainement d'apporter des connaissances mécanistiques nouvelles en ce sens.

mots-clés

toxicité – RT – hadronthérapie – radiosensibilité individuelle – test prédictif

Improved tolerance of radiotherapy by an individual radiobiological approach and a unified conceptual approach in heavy ion radiotherapy.

Background. Each year, 175,000 patients are treated with radiotherapy (RT) in France. RT is involved in about 50% of cures. 60% of adults and 80% of children and adolescents treated for cancer heal, so that oncologists have to follow more long survivors. Quality of survival is an increasingly used indicator. Indeed since it is necessary to include a margin of normal tissue around the target volumes beyond the visible portion of a tumor, and because of the physical properties of photon beams, almost all patients treated with conformational RT are exposed to early toxicity including 10 to 15% at a high level considered "unusual" by an experienced radiation oncologist; 3-5% of adults suffer from late toxicity that can cause potentially serious sequelae. In particular, the incidence of sequelae at least 30 years after diagnosis of cancer reaches a cumulative incidence of 73.4% in paediatric oncology. Innovative techniques using photon beams contribute as a relevant but inappropriate ballistic solution for 10-12% of tumors located either in close contact with particularly sensitive healthy tissue, or very radioresistant far exceeding the tolerance of the neighbouring tissues, or for the patients who display an excessive individual radiosensitivity. Two approaches developed in our hosting teams hold the promise of solutions to these situations.

1- Contribution to the development of carbon ion radiotherapy (CIRT)

Problematic. Carbon ions are particles with mass and charge which gives them a particularly interesting biological and ballistic advantage for certain inoperable and very radioresistant tumors that currently are genuine therapeutic impasses. The rarity of eligible tumors and very few available centers have failed to develop classical randomized studies to assess the actual benefit of this expensive therapy.

Objectives. Such studies that appear necessary must involve collaboration between the different treatment centers. This pooling of data - assumed comparable - must be based on a standardization of practices, the definition of adapted dose-volumes concepts and a more complete biological modeling.

Methodology. In FP7 ULICE program, we integrated and animated several national (researchers and clinicians involved in the Regional Programme for Research in CIRT) and international groups. We had to provide key deliverables on a schedule imposed by the European Commission (EC). We were particularly involved in WP 2, 7, 9, 10 and 11. Deliverables have emerged from consensual discussions based on expert reports, working parties with focus group or questionnaires submitted to the medical and scientific community. Deliverables were then validated by the WP, the pillar and finally the project coordinators before submission to the EC.

Results. We have been directly involved in the production of SOPs in terms of immobilization devices, minimal dataset, CIRT studies structuring and processing of data into exchangeable metadata. In the absence of specific recommendations of the ICRU, we have proposed original concepts describing the prescribed dose and the volume of interest, beyond the "simplistic" RBE concept.

Perspectives. All results provided tend to harmonize practices of CIRT, required for Phase III studies claimed by policymakers. However, some limitations exist: failure of biological modeling, lack of biological data on particularly healthy tissue, low availability of dedicated radiobiology facilities. CERN plans to provide researchers with a beam line (LEIR) in that aim.

2- A new biomarker for individual radiosensitivity

Problematic. The identification of the patients most at risk of developing the most severe reactions remains a major challenge of modern radiotherapy, yet raised there over a century. With improved molecular understanding of DNA damage response, many predictive assays of individual radiosensitivity have developed. None has been recognized as the gold standard to date. From fibroblasts cultured from patients with genetic disorders conferring hyper radiosensitivity or unusual pattern of toxicity to RT, the rate of unrepaired DNA double strands (DSB) 24h after radiation estimated by indirect immunofluorescence (IIF marker γ H2AX) has defined three groups of RS. However this single marker does not provide adequate strength of correlation with the severity of toxicities.

Objectives. By observing certain cell lines from radiosensitive patients without any DSB repair defect, it seemed that some defective cytoplasmic proteins could be involved in radiation-sensitive phenotype; the latter can be restored with farnesyl transferase inhibitors. Our interest has focused on the identification of a novel biomarker of RS from these observations.

Methodology. We have enriched the collection of fibroblast primocultures from patients reporting an

unusual toxicity to RT (COPERNIC study) and conducted IFI tests with additional markers. Each new protein of interest was quantified by Western blot using a panel of cell lines of the collection. In parallel, interesting biomarkers need to be clinically validated; we developed a prospective, national, multicenter validation study of the assay in a pediatric population (ARPEGE study). Inter tissue variations of the biomarker of interest were finally studied in a preliminary single-center prospective trial (PREVIRAS study).

Results. This work allowed us to identify pATM foci as very informative, suggesting a nucleoshuttling of the protein after irradiation. This transit may be altered by mutated proteins in radiosensitive syndromes not associated with DSB repair defects. The period for ATM nucleoshuttling appears to refine our classification of human RS. Associated with γ H2AX, pATM biomarker seems to predict the severity of the RT induced early and late toxicities. A new mechanistic model has thus been developed.

Perspectives. The tissue specificity of this new biomarker of individual RS has been tested prospectively in a population of patients treated for breast cancer in our institution. Analysis of the results is in progress. ARPEGE study was fully funded and will begin in late 2014. This essential step will point to a further development of this combined assay for a systematic characterization of patients requiring RT to customize the prescription.

General conclusion. The basic concepts developed in the team may interest the community in the harmonized modeling of biological dose to healthy tissue subjected to CIRT. Indeed, ULICE has generally neglected the issue of healthy tissue irradiated to high RBE. α/β ratios applied to healthy tissues are definitely to be redefined with relevant experimental models. The new model of pATM nucleoshuttling will certainly provide new mechanistic knowledge in this direction.

keywords

toxicity – radiotherapy - Heavy Ion Radiotherapy – individual radiosensitivity – predictive assay

**unité INSERM CR-U1052
Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon
Groupe de Radiobiologie - Bât Cheney A - 1er étage
28 Rue Laennec
69008 Lyon**

Remerciements

Aux Membres du jury :

- Pr Didier Peiffert : merci pour votre soutien qui permet mon épanouissement professionnel et personnel
- Pr Marco Krengli : merci pour l'expertise internationale que vous apportez en rapportant ce travail.
- Dr Jean-Pierre Pouget : merci d'avoir accepté de rapporter mes travaux avec un regard radiobiologique critique et bienveillant
- Pr Jean-Yves Blay : merci pour votre écoute et votre accessibilité; je me réjouis de collaborer avec vous dans notre thématique passionnante des sarcomes
- Pr Pierre Verrelle : merci pour le plaisir que vous me faites d'accepter de juger mon travail, sachant l'intérêt que vous avez toujours porté à nos travaux en radiobiologie transversale.
- Dr Nicolas Foray : merci Nicolas pour ces échanges passionnants, pour ton humanisme, ta rigueur scientifique et l'amitié dont tu m'honores. Vivement la suite !
- Pr Jacques Balosso : merci Jacques de m'avoir offert tant de temps ces 5 dernières années; je me suis senti considéré comme un membre de votre famille et vous en suis infiniment reconnaissant. J'admire votre capacité d'écoute, votre ligne de conduite et l'Homme que vous êtes.

Aux Fondations et Sociétés savantes qui nous ont aidés :

- Fondation des Treilles
- Société Française de Pédiatrie
- Fondation Lucien Mallet

Aux équipes qui nous ont offert leur soutien :

- Le Groupe N. Dalla Venezia, en particulier Nicole, Anne, Elise et Estelle : un grand merci d'avoir eu la patience de m'apprendre à étaler du film alimentaire sur ma paillasse sans piéger de bulles d'air; je vous dois les résultats de mes WB.
- L'équipe du Centre de Biotechnologie Lyon Est, en particulier Marie-Thérèse, Isabelle, Clémence et toutes les techniciennes : merci pour l'enthousiasme partagé lors de la mise en place des procédures de culture cellulaire

spécialisées

- Le Groupe de radiobiologie Inserm CRU1052 : Nicolas, Clément, Adeline, Mélanie, Larry et toute la bande. Merci pour ces 4 années passionnantes. Nous poursuivrons nos projets dans les années à venir. Clin d'œil spécial à Clément, mon petit frère à blouse blanche, qui a toujours su assurer la continuité des manipulations et sans qui cette thèse n'aurait sans doute pas été réalisable.
- L'équipe de Recherche clinique de l'ICL : merci de m'aider à transférer nos concepts au lit du patient
- Le Département de Radiothérapie de l'ICL : merci à l'ensemble de mes collègues pour votre compréhension et votre soutien durant ces 3 dernières années. Merci en particulier au Dr Christian Marchal qui a su me communiquer son enthousiasme.
- L'ensemble des membres du WP2 d'ULICE : Pr Wambersie, Pr Pötter, Pr Mayer, Dr Mock, Dr Magrin, Dr Schmid, Dr Schreiner, Dr Fossati; merci pour ces échanges passionnés et avant-gardistes. Vous m'aurez beaucoup appris.
- Les équipes de recherche France-Hadron ARA, en particulier le Pr Jean-Michel Moreau, Marianne Tery : merci de m'avoir intégré au sein de votre communauté.

A mes amis :

- A l'ensemble de mes amis rémérévillois, thionvillois, bostoniens, nancéens et à mes potes de fac

A ma Famille :

- A mes parents, mon frère, ma sœur, mes mamies : merci pour soutien dans les moments de doute et pour la ligne de conduite que vous m'inspirez.
- A mes beaux-parents, Fred, mamie Arlette : merci d'avoir pris soin de ma petite tribu lorsque je n'étais pas présent
- A Célestine enfin et mes deux poupons : Daddy's back !!! Adieu le papa thésard ! je vous aime

Sommaire

RESUME	3
REMERCIEMENTS	7
SOMMAIRE	9
LISTE DES TABLEAUX	14
LISTE DES FIGURES	15
LISTE DES ABREVIATIONS	17
INTRODUCTION GENERALE	18
1. LES TOXICITES TISSULAIRES OBSERVEES APRES RT	22
1.1. L'INDEX THERAPEUTIQUE: DEFINITIONS ET PARADIGMES ACTUELS	22
1.1.1. Dose de contrôle tumoral.....	24
1.1.2. Dose de tolérance des organes à risque.....	25
1.1.3. Effets précoces et effets tardifs.....	27
1.1.4. Effets déterministes ou stochastiques ?.....	28
1.1.5. Conclusion préliminaire.....	28
1.2. L'INDEX THERAPEUTIQUE : DE LA DEMARCHE HISTORIQUE AUX PRATIQUES ACTUELLES.....	29
1.3. IMPACT PHYSIQUE, PSYCHOLOGIQUE, ECONOMIQUE ET SOCIAL DES SEQUELLES : LA REALITE DE LA MORBIDITE.....	37
1.4. PRISE EN COMPTE DE LA TOXICITE DANS L'EVALUATION DES NOUVEAUX TRAITEMENTS	40
1.4.1. Renouveau des principes d'évaluation	40
1.4.2. L'exemple des cancers de la prostate.....	43
1.4.3. Echelles d'évaluation de la toxicité tissulaire.....	45
1.5. APPROCHES PREVENTIVES DES TOXICITES	51
1.5.1. Prévention primaire	52
1.5.2. Prévention secondaire.....	53
1.5.3. Prévention tertiaire	53
2. DETERMINANTS DES EFFETS TISSULAIRES DES RADIATIONS	55
2.1. LA RADIOSENSIBILITE INTRINSEQUE	55
2.1.1. Historique et Définition.....	55
2.1.2. Effet du cycle cellulaire	58
2.1.3. L'effet oxygène	58
2.1.4. Autres paramètres influant la réponse à l'irradiation.....	59
3. MECANISMES D'ACTION DES RADIATIONS IONISANTES	64
3.1. PRINCIPES GENERAUX.....	64
3.1.1. Evènements physiques radio induits	64
3.1.2. Evènements chimiques radio induits	65
3.1.3. Evènements biochimiques et biologiques radio induits.....	66
3.1.4. Inflammation et réactions tissulaires.....	68
3.2. SPECTRE DES LESIONS RADIO INDUITES	69
3.3. LES CASSURES DOUBLE-BRIN DE L'ADN, DETERMINANTS MAJEURS DE LA LETALITE CELLULAIRE RADIO INDUITE.....	71
3.4. SIGNALISATION ET REPARATION DES CDB.....	73
3.4.1. Signalisation des CDB	73
3.4.2. Principales voies de réparation de l'ADN (Figure 12).....	75

3.4.3. ATM, protéine centrale de la réponse cellulaire aux dommages radio induits de l'ADN
78

4.	LA RADIOSENSIBILITE INDIVIDUELLE	83
4.1.	DESCRIPTION HISTORIQUE (FIGURE 16).....	84
4.2.	PATHOLOGIES HUMAINES ASSOCIEES A UNE RADIOSENSIBILITE INDIVIDUELLE ACCRUE	86
4.3.	IMPACT SOCIETAL DANS LES DOMAINES DES FORTES ET FAIBLES DOSES.....	93
4.3.1.	En RT.....	93
4.3.2.	En radiologie, chez les travailleurs du nucléaire et les spationautes.....	94
4.4.	RATIONNEL DE DEVELOPPEMENT DES TESTS PREDICTIFS DE RADIOSENSIBILITE	96
4.5.	ETAT DE L'ART SUR LA THEMATIQUE DES TESTS DE RADIOSENSIBILITE INDIVIDUELLE.....	98
4.5.1.	Tests de fonctionnalité de la réponse cellulaire aux dommages radio induits de l'ADN	99
4.5.2.	Tests intégratifs.....	103
4.5.3.	Tests s'intéressant aux protéines de la fibrogénèse.....	105
4.5.4.	Tests ciblant d'autres modalités de mort cellulaire	105
4.5.5.	Autres tests	107
4.5.6.	Résultats publiés	108
4.5.7.	Courants actuels.....	111
5.	L'HADRONTHERAPIE : UNE SOLUTION TECHNIQUE PLUS EFFICACE ET MOINS TOXIQUE ?	112
5.1.	REVOLUTION TECHNOLOGIQUE DE LA RT CONVENTIONNELLE	112
5.1.1.	Une meilleure définition des volumes	112
5.1.2.	Une meilleure distribution de la dose délivrée.....	113
5.1.3.	Les volumes de tissus sain irradiés.....	116
5.1.4.	Un sur risque carcinogène ?.....	116
5.1.5.	Place des techniques innovantes dans l'arsenal radiothérapeutique.....	118
5.2.	L'HADRONTHERAPIE.....	120
5.2.1.	Technologie mise en œuvre.....	123
5.2.2.	Propriétés physiques des hadrons.....	124
5.2.3.	Éléments de radiobiologie comparée : quels mécanismes biologiques sont mis en jeu au profit de l'EBR ?	129
5.3.	PRINCIPALES INDICATIONS ET RESULTATS CLINIQUES DE L'HADRONTHERAPIE PAR IONS CARBONE	142
5.3.1.	Indications.....	142
5.3.2.	Données cliniques de toxicité tissulaire et seconds cancers.....	145
5.4.	EFFICIENCE ECONOMIQUE.....	148
	APPROCHE GENERALE DE L'EQUIPE D'ACCUEIL	150
	150
1.1.	UNE PREMIERE CORRELATION QUANTITATIVE ENTRE RADIOTOXICITE ET CDB NON REPARÉES .	150
1.2.	UNE VOIE DE REPARATION ALTERNATIVE	152
1.3.	DES SYNDROMES RADIOSENSIBLES SANS MUTATION DE GENE DE REPARATION DES DOMMAGES RADIO INDUITS	152
1.4.	LA GENESE DU MODELE DU TRANSIT CYTO-NUCLEAIRE D'ATM	153
	BUTS DE LA THESE	154
1.	CONTEXTE PERSONNEL.....	154
1.1.	HADRONTHERAPIE.....	155
1.2.	RECHERCHE DE NOUVEAUX BIOMARQUEURS DE RADIOSENSIBILITE INDIVIDUELLE	158
2.	OBJECTIFS DE LA THESE.....	159
2.1.	PROGRAMME ULICE.....	159
2.2.	RECHERCHE DE NOUVEAUX BIOMARQUEURS DE RADIOSENSIBILITE INDIVIDUELLE	161

MATERIELS ET METHODES.....	164
1. PROGRAMME ULICE.....	164
2. RECHERCHE DE NOUVEAUX BIOMARQUEURS DE RADIOSENSIBILITE INDIVIDUELLE	167
2.1. CRITERES D'INCLUSION ET DEROULEMENT DE L'ETUDE COPERNIC.....	167
2.2. COTATION DES TOXICITES.....	167
2.3. ANTICORPS.....	167
2.4. PRELEVEMENTS DERMiques CHEZ LES PATIENTS.....	167
2.5. PRELEVEMENTS DANS LE CADRE DE L'ETUDE PREVIRAS.....	168
2.6. CULTURE PRIMAIRE DES FIBROBLASTES DERMiques DEPUIS LA BIOPSIE DE PEAU.....	168
2.6.1. <i>Mise en culture primaire</i>	168
2.6.2. <i>Suivi de la culture</i>	169
2.7. ISOLEMENT DES LYMPHOCYTES DEPUIS LE PRELEVEMENT SANGUIN.....	169
2.8. CULTURE PRIMAIRE DES FIBROBLASTES MAMMAIRES DEPUIS LA BIOPSIE DE TISSU PERITUMORAL	169
2.8.1. <i>Mise en culture primaire</i>	169
2.8.2. <i>Suivi de la culture</i>	170
2.9. CULTURE PRIMAIRE DES CELLULES EPITHELIALES MAMMAIRES DEPUIS LA BIOPSIE DE TISSU	
PERITUMORAL.....	170
2.9.1. <i>Mise en culture primaire</i>	170
2.9.2. <i>Suivi de la culture</i>	171
2.10. CULTURE PRIMAIRE DES CELLULES TUMORALES DEPUIS LA BIOPSIE TUMORALE.....	171
2.11. AMPLIFICATION DES LIGNEES.....	172
2.12. ARCHIVAGE DES LIGNEES.....	172
2.13. IRRADIATION CONVENTIONNELLE PHOTONS (A CONFLUENCE ET A 4°C).....	172
2.14. TESTS D'IMMUNOFLOUORESCENCE INDIRECTE.....	173
2.15. SEPARATION NUCLEO-CYTOPLASMIQUE.....	173
2.15.1. <i>Matériel et réactifs</i>	173
2.15.2. <i>Préparation des cellules et fractionnement</i>	175
2.15.3. <i>Dosage des protéines dans les différents extraits</i>	175
2.16. WESTERN BLOTS.....	176
2.16.1. <i>Equilibration des extraits en tampon et en KCl en vue de la migration</i>	176
2.16.2. <i>Calcul des quantités d'échantillons à déposer sur gel</i>	176
2.16.3. <i>Dépôt et migration des échantillons</i>	177
2.16.4. <i>Transfert sur membrane</i>	177
2.16.5. <i>Hybridation</i>	177
2.16.6. <i>Révélation</i>	178
RESULTATS.....	179
1. PROGRAMME ULICE.....	179
1.1. D 2.1 HARMONISATION DES CONCEPTS ET TERMINOLOGIE APPLIQUES AUX PARAMETRES DE DOSE	
ET DE VOLUME EN PHOTON-, PROTON- ET CARBONETHERAPIE. (ANNEXE 1.1).....	179
1.2. D 2.3 DESCRIPTION DES TACHES AVEC UN PROJET POUR LES STRUCTURES POTENTIELLES DE	
RECHERCHE CLINIQUE AU SEIN D'ULICE. (ANNEXE 1.2).....	181
1.3. D 2.5 HARMONISATION ET RECOMMANDATIONS DE PRESCRIPTION ET RAPPORT DE LA DOSE	
ABSORBEE ET DES HISTOGRAMMES DOSE-VOLUME BASE SUR DES CONCEPTS 3D & 4D. (ANNEXE 1.3).....	182
1.4. D 2.7 MODALITES DE RECHUTE TUMORALE ET DE "TOXICOGENESE" EN CARBONETHERAPIE.	
(ANNEXE 1.4).....	183
1.5. D 2.9 CONCEPTS INTEGRES DE DOSE ABSORBEE 3D/4D ET VARIATIONS DES EFFETS BIOLOGIQUES	
AVEC L'EBR, LE FRACTIONNEMENT ET L'ETALEMENT. (ANNEXE 1.5).....	184
1.6. D 7.3 SERVICES DEVELOPPES POUR L'ACQUISITION ET L'EXPLOITATION DES DONNEES (ANNEXE	
1.6).....	185

1.7.	D 9.1 RAPPORT SUR LES ASPECTS SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES DES CENTRES EXISTANTS ET PLANIFIES, SUR LES ASPECTS DEMOGRAPHIQUES ET GEOGRAPHIQUES DE LA DISTRIBUTION DES CENTRES ET SUR LES CRITERES CLINIQUES D'ELIGIBILITE A LA CARBONETHERAPIE. (ANNEXE 1.7).....	186
1.8.	D 10.3 PROTOCOLES STANDARDISES DES CENTRES ACTIFS (ANNEXE 1.8) & D 10.5 SITE WEB D'ULICE MIS A JOUR AVEC LES PROTOCOLES STANDARDISES [MOIS 42] (ANNEXE 1.9)	187
1.9.	D 11.11 ELABORATION ET IMPLEMENTATION DES ESSAIS CLINIQUES (ANNEXE 1.10) & D 11.8 ESPACE DEDIE SUR LE SITE WEB D'ULICE POUR LE PARTAGE DE DONNEES CLINIQUES (ANNEXE 1.11)	188
2.	RECHERCHE DE NOUVEAUX BIOMARQUEURS DE RADIOSENSIBILITE INDIVIDUELLE	189
2.1.	ARTICLE 1 : RADIOSENSIBILITE, RADIOCURABILITE ET REPARATION	190
2.2.	ARTICLE 2 : LA LOI DE TRIBONDEAU & BERGONIE : UNE FORMULE SEDUISANTE POUR UNE PREMIERE APPROXIMATION	192
2.3.	ARTICLE 3 : BIOLOGIE DES RADIATIONS : DES MODELES A LA REALITE CLINIQUE	194
2.4.	ARTICLE 4 : REPONSE INDIVIDUELLE AUX RADIATIONS IONISANTES : QUEL(S) TEST(S) PREDICTIF(S) CHOISIR ?	195
2.5.	ARTICLE 5 : RADIOSENSIBILITE ET POLYMORPHISMES : COMMENT PROGRESSER ?.....	197
2.6.	ARTICLE 6 : IMPACT DU TRANSIT CYTO-NUCLEAIRE DE LA PROTEINE ATM EN REPONSE A LA RADIOTHERAPIE : VERS UNE CLASSIFICATION MOLECULAIRE DE LA RADIOSENSIBILITE HUMAINE	199
	DISCUSSION & PERSPECTIVES	201
1.	PROGRAMME ULICE.....	201
1.1.	PERTINENCE DES CONCEPTS ET OUTILS DEVELOPPES	201
1.2.	SUCCES DU PROGRAMME	203
1.2.1.	WP2.....	203
1.2.2.	WP7.....	206
1.2.3.	WP10.....	207
1.2.4.	WP11.....	207
1.3.	PERSPECTIVES GENERALES.....	208
2.	RECHERCHE DE NOUVEAUX BIOMARQUEURS DE RADIOSENSIBILITE INDIVIDUELLE	209
2.1.	JUSTIFICATION METHODOLOGIQUE	209
2.1.1.	<i>Technique.....</i>	<i>209</i>
2.1.2.	<i>Modèle cellulaire.....</i>	<i>210</i>
2.1.3.	<i>Dose d'irradiation.....</i>	<i>212</i>
2.1.4.	<i>Echelle de temps.....</i>	<i>212</i>
2.1.5.	<i>Modèle expérimental.....</i>	<i>212</i>
2.2.	PERTINENCE DU MODELE FONDE SUR LA TRANSIT CYTO-NUCLEAIRE D'ATM	213
2.2.1.	<i>Un dogme brisé.....</i>	<i>214</i>
2.2.2.	<i>Le transit nucléo-cytoplasmique des protéines et son implication en pathologie humaine.....</i>	<i>217</i>
2.3.	PERSPECTIVES.....	222
2.3.1.	<i>Cognitives.....</i>	<i>222</i>
2.3.2.	<i>Recherche clinique appliquée : les 3 principaux projets.....</i>	<i>223</i>
	CONCLUSION GENERALE.....	227
	REFERENCES.....	229
	INDEX.....	252
	ANNEXES	254
1.	DELIVRABLES PUBLIEES DANS LE CADRE DU PROJET ULICE	254
1.1.	D 2.1 HARMONIZATION OF CONCEPTS AND TERMS FOR VOLUME AND DOSE-VOLUME PARAMETERS IN PHOTON, PROTON AND CARBON-ION THERAPY (ANNEXE 1.1)	254

1.2.	D 2.3 DESCRIPTION OF TASKS WITH A PROPOSAL FOR POTENTIAL STRUCTURES FOR CLINICAL RESEARCH IN ULICE (ANNEXE 1.2)	254
1.3.	D 2.5 HARMONIZATION AND RECOMMENDATIONS FOR PRESCRIBING AND REPORTING ABSORBED DOSES AND DOSE-VOLUME HISTOGRAMS BASED ON 3D AND 4D CONCEPTS (ANNEXE 1.3)	254
1.4.	D 2.7 PATTERN OF TUMOR RELAPSE AND "TOXICOGENESIS" IN CARBON ION RT (CIRT) (ANNEXE 1.4)	254
1.5.	D 2.9 INTEGRATED CONCEPT OF 3D/4D ABSORBED DOSE AND VARIATIONS OF BIOLOGICAL EFFECTS WITH RBE, FRACTIONATION AND OVERALL TIME (ANNEXE 1.5).....	254
1.6.	D 7.3 SERVICES FOR DATA ACQUISITION AND PROCESSING (ANNEXE 1.6).....	254
1.7.	D 9.1 REPORT ON SCIENTIFIC AND TECHNICAL ASPECTS OF THE EXISTING AND PLANNED INFRASTRUCTURES, ON DEMOGRAPHIC AND GEOGRAPHIC ASPECTS OF THE EUROPEAN FACILITY DISTRIBUTION AND ON CLINICAL CRITERIA OF ELIGIBILITY FOR HADRONTHERAPY (ANNEXE 1.7).....	254
1.8.	D 10.3 WRITTEN PROTOCOLS STANDARDIZING FEATURES OF THE ACTIVE FACILITY (ANNEXE 1.8) & D 10.5 ULICE WEBSITE WITH STANDARDIZED PROTOCOLS [MONTH 42] (ANNEXE 1.9).....	254
1.9.	D 11.11 DESIGN AND IMPLEMENTATION OF CLINICAL TRIALS (ANNEXE 1.10) & D 11.8 DEDICATED SPACE ON THE ULICE WEB SITE FOR CLINICAL ACCESS (ANNEXE 1.11).....	254
2.	PROTOCOLES D'ESSAIS CLINIQUES EN RAPPORT AVEC LA THESE	254
2.1.	COPERNIC	254
2.2.	EVIRAS.....	254
2.3.	PREVIRAS	254
2.4.	ARPEGE.....	254

Liste des tableaux

Tableau 1 : TD5/5 et TD 50/5 des principaux OAR d'après (19).....	21
Tableau 2 : Relation dose-volume-effet des principaux OAR, d'après QANTEC (39)	34
Tableau 3 : Incidence des effets tardifs liés aux traitements des cancers de prostate (59).....	44
Tableau 4 : Comparatif des coûts moyens annuels des traitements locaux et de leur complications pour les cancers de la prostate d'après (62).	44
Tableau 5 : Echelle de toxicité précoce du RTOG, version US (1995)	46
Tableau 6 : Echelle de toxicité tardive du RTOG, version US (1995)	47
Tableau 7 : Exemple de la toxicité mammaire cotée par l'échelle SOMA-LENT.....	48
Tableau 8 : Biomarqueurs mis en évidence par Fertil et Malaise pour stratifier les lignées cellulaires selon leur radiosensibilité.	57
Tableau 9 : Valeurs α/β des principaux tissus sains, compilation de données précliniques et cliniques, d'après (102)	58
Tableau 10 : Syndromes génétiques liés à une radiosensibilité individuelle et/ou une prédisposition au cancer recensés en 2014	92
Tableau 11 : Tableau de contingence applicable aux tests prédictifs de radiosensibilité individuelle .	97
Tableau 12 : Résultats publiés des principaux tests prédictifs de radiosensibilité individuelle.	110
Tableau 13 : Synthèse des indications validées et potentielles d'hadronthérapie (ions carbone, protons, neutrons) et de techniques innovantes en photon thérapie (RT stéréotaxique ; RCM) ayant fait l'objet d'une évaluation institutionnelle en France (HAS ; ANAES ; CCAM ; INCa)	119
Tableau 14 : Synthèse des indications des principales techniques avancées de RT ayant fait l'objet d'évaluation institutionnelles.....	119
Tableau 15 : Principales radiations utilisées en RT et leurs caractéristiques physiques	125
Tableau 16 : TEL des principales radiations utilisées en RT	126
Tableau 17 : Rendement biologique moyen dans une cellule de mammifère irradiée à la dose d'1Gy (342).	130
Tableau 18 : Indications consolidées (source GCS ETOILE)	143
Tableau 19 : Indications « prospectives » (source GCS ETOILE)	144
Tableau 20 : Indications exceptionnelles (source GCS ETOILE).....	144
Tableau 21 : Tolérance rapportée par les principaux essais cliniques japonais [JBalosso, GCS-ETOILE, 2013].....	148
Tableau 22 : Calendrier de remise des livrables dans la rédaction desquelles nous avons été impliqué.	166
Tableau 23 : Synthèse des voies dans lesquelles ATM intervient selon sa compartimentation	216
Tableau 24 : pathologies associées à une altération de la structure/fonction des protéines transportées.....	221
Tableau 25 : pathologies associées à une altération structurelle ou fonctionnelle des protéines de transport	221
Tableau 26 : pathologies associées à une altération structurelle ou fonctionnelle du pore nucléaire	221

Liste des figures

Figure 1: Représentation des concepts de volumes en RT; les flèches symbolisent l'influence que peut avoir le contourage des OAR sur celle du PTV selon la priorité donnée par le radiothérapeute; source ICRU.....	24
Figure 2 : Document dosimétrique prévisionnel d'une IMRT avec les distributions anatomiques de doses et l'histogramme dose-volume cumulatif; irradiation postopératoire d'un chordome lombaire (doc. Institut de cancérologie de Lorraine)	31
Figure 3 : Taux de complications pulmonaires tardives observées à partir d'une compilation des HDV de patients inclus dans des essais de RT thoracique. Lignes iso taux de complication s'étalant de 0,2 (en bas à gauche) à 0,9 (autour des zones rouges) ; $IC_{68\%}$ (42).....	36
Figure 4 : Méthodologie des études coût-efficacité promue par le RTOG, d'après (4)	42
Figure 5: Solutions développées pour améliorer l'index thérapeutique en RT, d'après (6).....	51
Figure 6 : Forme générique d'une courbe de survie d'une lignée cellulaire de mammifère.....	57
Figure 7 : Effet différentiel du fractionnement selon le ratio α/β , d'après (110).....	61
Figure 8 : Modélisation de la survie cellulaire au cours de la progression d'une irradiation fractionnée, avec l'amplification cumulée de l'effet différentiel (modifié, d'après JBalosso)	61
Figure 9: Voie de signalisation de la réponse cellulaire aux dommages radio induits de l'ADN	67
Figure 10: Voie de la fibrogenèse dépendant de $TGF\beta$, d'après (23)	69
Figure 11: Spectre des lésions radio induites de l'ADN	70
Figure 12: Voies communes de réparation des CDB d'après (148)	78
Figure 13 : Structure de la protéine ATM	80
Figure 14 : Substrats nucléaires et voies de signalisation dépendantes de pATM d'après (3).....	81
Figure 15 : Répartition de la radiosensibilité individuelle au sein de la population générale ; adaptée de (183). Les sujets souffrant de réparatose se projettent à l'extrême gauche de cette courbe (overreactors). Les doses maximales recommandées sur les OAR prescrites sont calquées sur les 5% de patients réputés radiosensibles, sujets à des réactions inhabituellement sévères.	83
Figure 16 : Histoire du concept de radiosensibilité individuelle : quand biologie et clinique se renvoient la balle ; d'après (186).....	85
Figure 17: Doses délivrées par les principales interventions médicales (source ASN).	93
Figure 18 : Distribution des tests prédictifs existants au sein de la voie de la réponse cellulaire aux dommages radio induits de l'ADN.....	98
Figure 19 : Répartition des actes de RT innovante en France en 2010 (source INCa)	114
Figure 20 : Répartition des traitements selon le type de dosimétrie en France, en 2010 (source INCa)	114
Figure 21 : Principaux centres d'hadronthérapie dans le monde en 2014	123
Figure 22 : Trace des principaux hadrons (source : (2))	125
Figure 23 : Courbes de rendement en profondeur des principales radiations utilisées en RT.....	128
Figure 24 : Courbes de diffusion latérale et variation de l'EBR en profondeur des principales espèces ioniques testées, d'après (340, 341).	128
Figure 25 : EBR comparée de 5 particules à différentes profondeurs de leur courbe de rendement en profondeur; (diapositive présentée par O Jäkel, ESTRO 31, Barcelone, 2012; test des cryptes intestinales, SOPB de 8 cm)	129
Figure 26 : Immunofluorescence γ H2AX 30 minutes après irradiation de cellules RKO :	130
Figure 27 : Courbes de survie pour des cellules CHO de hamster: rayons X ou particules de TEL moyen (hautes énergie du canal d'entrée) ou particules de TEL élevé (région du SOB), (GSI, Darmstadt, Allemagne).....	132
Figure 28 : Voies de signalisation activées après irradiation par ions fer et rayons X à la	133
Figure 29 : Courbes de survie illustrant l'OER et son abolition avec la majoration du TEL; Cellules rénales humaines T1, hypoxie (cercles pleins), normoxie (cercles vides); d'après (380).....	134
Figure 30 : Courbe de survie de cellules de mammifère en irradiation neutron à dose unique, d'après E.Hall; Lippincott Co, 1994.	136
Figure 31 : Courbes iso effets pour les photons (gauche) et les neutrons (droite) selon le fractionnement pour divers types de tissus sains à réponse précoce (tirets) et tardive (traits pleins). Etudes in vivo sur modèles murins, d'après (7)	136
Figure 32 : Relation EBR carcinogénétique-TEL pour diverses lignées d'après (5)	138
Figure 33 : Rationnel de l'hadronthérapie	141

<i>Figure 34 : Dosimétrie d'une carbone thérapie exclusive à l'encontre d'un chordome cervical inopérable traité à HIT (donnée personnelle).....</i>	<i>145</i>
<i>Figure 35: Classification de la radiosensibilité en 3 groupes proposée par l'équipe d'accueil sur la base des CDB non réparées à 24h.....</i>	<i>151</i>
<i>Figure 36 : Etat de l'Evidence Based Medicine en hadronthérapie en 2009, d'après (407).....</i>	<i>157</i>
<i>Figure 37: Vision personnalisée de l'intersection des thématiques rapportées dans la thèse permettant d'en soulever des objectifs originaux.....</i>	<i>159</i>
<i>Figure 38 : Organisation et thématiques du projet ULICE.....</i>	<i>161</i>
<i>Figure 39 : Schéma expérimental global de la partie biologique de la thèse</i>	<i>163</i>
<i>Figure 40 : Feuille de donnée remplie pour chaque manipulation de fractionnement.....</i>	<i>176</i>
<i>Figure 41 : Montage des gels.....</i>	<i>177</i>
<i>Figure 42 : Modèle actuel de l'équipe d'accueil.....</i>	<i>214</i>
<i>Figure 43 : Substrats cytoplasmiques et voies de signalisation dépendantes d'ATM d'après (452)..</i>	<i>216</i>
<i>Figure 44 :Structure des pores nucléaires humains, d'après (456).....</i>	<i>218</i>
<i>Figure 45 : Schéma de la voie d'importation nucléaire princeps d'après (1).....</i>	<i>219</i>

Liste des abréviations

ALRI : apoptose lymphocytaire radio induite
ASN : autorité de sûreté nucléaire
(p)ATM : (phospho) *Ataxia Telangiectasia Mutated*
BED : dose biologique équivalente
CDB : cassure double brin
CLE : *consequential late effects*
CSB ; cassure simple brin
CTCAE : *Common Terminology Criteria for Adverse Events*
CTV : *clinical target volume*
EBR/RBE : efficacité biologique relative/relative biological effectiveness
EQD2 : dose équivalent 2Gy
GTV : *gross target volume*
Gy : gray
Gy_{isoE} : gray iso efficace
H2AX : membre X de la famille d'histones H2A
HDV : histogramme dose-volume
IFI : immunofluorescence indirecte
IFT : inhibiteur de farnesyl transférase
IGRT : RT guidée par l'imagerie/Image-guided radiotherapy
LQ : linéaire quadratique
NHEJ : suture/non homologous end joining
NES : *nuclear export signal*
NLS : *nuclear localization signal*
NTCP : normal tissue complication probability
OAR : organe à risque
OER : *oxygen enhancement ratio*
PON : procédure opérationnelle normalisée
PTV : planning target volume
RCMI/IMRT : RT conformationnelle avec modulation d'intensité/*intensity modulated radiation therapy*
RT : radiothérapie
RT3D : RT conformationnelle
SF2 : fraction de survie à 2Gy
SNP : *single nucleotide polymorphism*
SOBP : *Spread Out Bragg Peak*
TCP : *tumor control probability*
TDn/5 : dose de tolérance correspondant à la dose causant n% de complication à 5 ans si elle est délivrée de manière homogène et en fractionnement classique
TEL/LET : transfert d'énergie linéique/linear energy transfer
TEP : tomographie par émission de positrons
TGF : *transforming growth factor*
TPS : *treatment planning system*
UCBL : Université Claude Bernard Lyon 1
ULICE : *Union of Light Ion Centers in Europe*
VADS : voies aérodigestives supérieures
WP : *Work Package*

Introduction générale

La radiothérapie (RT) est une méthode de traitement locorégional des cancers, utilisant des radiations ionisantes pour détruire les cellules cancéreuses tout en épargnant les tissus sains périphériques. Chaque année en France, 355 000 nouveaux patients sont pris en charge pour un cancer et 148 000 décès sont recensés (chiffres de 2012)(8). Environ 175 000 sont traités par RT. Son efficacité est unanimement reconnue : elle participe à environ 50 % des guérisons pour un coût représentant moins de 10% du total des dépenses consacrées au cancer.

Du fait du **caractère infiltrant** des tumeurs dans les tissus sains environnants et de l'existence **d'incertitudes** de repositionnement du patient et des organes à chaque séance de traitement, le radiothérapeute doit nécessairement inclure dans son plan de traitement un volume plus ou moins grand de tissus sains. Ce volume de tissus sains dépend de la nature histopathologique, du volume et de l'extension locorégionale de la tumeur, mais également du type de radiation, de la technique de RT, de la balistique choisie et aussi de l'expérience du radiothérapeute. **Cette contrainte qui ne peut être totalement réduite est la cause du caractère potentiellement toxique de toute RT.**

Par ailleurs, la tumeur et les tissus sains ont des radiosensibilités qui leur sont propres. Celles-ci dépendent de multiples facteurs endogènes (liés au patient) et exogènes (liés au traitement). La combinaison entre le volume irradié, certains paramètres temporels de la RT et le niveau de radiosensibilité des tissus doit permettre **un compromis** où le plus grand effet bénéfique de la RT doit être systématiquement recherché sans pour autant conduire à des toxicités, voire des séquelles, inacceptables pour le patient. Ce compromis doit être continuellement optimisé notamment du fait de l'efficacité croissante des traitements anti tumoraux qui augmente progressivement la survie des patients. Un effort de réduction des séquelles à long terme et d'amélioration de la qualité de vie est donc toujours plus nécessaire. Cet effort s'inscrit dans les objectifs généraux des Plans Cancer français.

Pour agir sur la toxicité de la RT il faut en comprendre les mécanismes et circonstances de survenue mais aussi avoir une approche pragmatique visant à faire porter l'effort d'optimisation sur les toxicités les plus importantes, les plus dangereuses et les moins réversibles. A cet égard il est utile de prendre en considération une certaine typologie et classification des diverses toxicités de la RT.

D'un point de vue médical **la classification chronologique** des toxicités et réactions indésirables observées est la plus opérationnelle. On distingue ainsi de manière quelque peu arbitraire **les effets précoces** apparaissant durant la RT et pouvant se développer jusque 3 mois après celle-ci ; et **les effets tardifs** au-delà de 3 mois(9).

Presque tous les patients sont exposés à une toxicité précoce dont 10 à 15% à un niveau important considéré comme « inhabituel » par un radiothérapeute expérimenté ; 3 à 5% des patients subissent une toxicité tardive pouvant entraîner des séquelles parfois graves (10-16) mais qui font actuellement partie du « risque calculé » que l'on accepte de faire subir à nos patients mais aussi du facteur limitant principal de toute RT (Tableau 1).

Il est donc important de proposer un seuil à partir duquel une réaction tissulaire peut être considérée comme **une toxicité induite ou une réaction réellement indésirable**. Là encore la définition de ce seuil ne peut résulter que d'un compromis entre les bénéfices attendus et le prix « toxique » que l'on considère acceptable pour les obtenir. Ceci relève donc nécessairement **d'un consensus professionnel** appelé à évoluer régulièrement et qui est défini actuellement comme suit en s'appuyant sur l'échelle internationale de gradation de 0 à 5 des toxicités iatrogènes (CTCAE) :

"Toute réaction précoce ou tardive radio induite survenant en l'absence de toute erreur de surdosage et de chimiothérapie ou thérapie ciblée concomitante et répondant à l'un des critères suivants:

- CTCAE 3.0 grade 2 ou plus survenant à très faible dose totale (1^{ère} semaine de traitement) ;

- CTCAE 3.0 grade 3-4 durant plus de 4 semaines après la fin de la RT et/ou requérant une intervention chirurgicale n'importe quand ;
- CTCAE 3.0 grade 3-4 survenant à ou persistant plus de 90 jours après la fin de la RT."(17).

Il faut signaler dès maintenant que, s'il peut exister un certain continuum entre ces toxicités précoces et tardives, dans leur forme typique, elles ne répondent pas du tout aux mêmes mécanismes physiopathologiques.

Les réactions précoces sont dues aux tissus à renouvellement rapide et ont tendance à disparaître sans séquelle à l'issue de la RT.

Les réactions tardives sont beaucoup plus complexes et seraient la combinaison de plusieurs phénomènes altérant progressivement la structure des tissus à renouvellement lent. A partir de leur apparition les réactions tardives ont tendance à s'auto entretenir et s'aggraver progressivement jusqu'à menacer le pronostic fonctionnel voire vital du patient.

On comprend donc que l'effort principal de prévention doit porter sur les toxicités tardives mais il est vraisemblable que les toxicités précoces puissent apporter une information sur la radiosensibilité des patients. Ceci représente une des hypothèses développées dans cette thèse.

Ces toxicités tardives justifient les limites de dose recommandées aux OAR, modélisée par la méthodologie NTCP afin de ne pas dépasser 5% à 5 ans, ce qui correspond au consensus actuel (Tableau 1). Toutefois il apparaît délicat de définir clairement des doses seuils pour chaque organe pour plusieurs raisons :

- complexité de l'organisation histologique et fonctionnelle des organes/tissus et disparité des symptômes subjectifs ou objectifs pouvant résulter de leur dysfonctionnement.
- multiplicité des échelles de toxicité.
- rareté des événements dans les séries (lorsque la toxicité est rapportée, elle l'est souvent de manière parcellaire) et manque de paramètres cliniques communs et significatifs pour les rapporter et les comparer.
- nécessité de regrouper les événements mais disparité des critères rapportés grevant la comparabilité des données (18).

	TD _{5/5} (Gy) selon volume			TD _{50/5} (Gy) selon volume			Conséquence
	1/3	2/3	3/3	1/3	2/3	3/3	
rein	50	30	23	--	40	28	insuffisance rénale
encéphale	60	50	45	75	65	60	nécrose
tronc cérébral	60	53	50	--	--	65	nécrose
oreille externe	30	30	30	40	40	40	otite aigue sévère
oreille externe	55	55	55	65	65	65	otite chronique sévère
œsophage	60	58	55	72	70	68	sténose / perforation
cœur	60	45	40	70	55	50	péricardite
vessie	--	80	65	--	85	80	atrophie / vessie de lutte
larynx	79	70	70	90	80	80	nécrose du cartilage
larynx	--	45	45	--	--	80	œdème laryngé
foie	50	35	30	55	45	40	insuffisance hépatique
poumon	45	30	17.5	65	40	24.5	pneumopathie
peau	10cm ² 70	30cm ² 60	100cm ² 55	10cm ² --	30cm ² --	100cm ² 70	nécrose / ulcération
intestin grêle	50	--	40	60	--	55	occlusion / perforation
colon	55	--	45	65	--	55	occlusion / perforation / ulcération / fistule
moelle épinière	5cm 50*	10cm 50	20cm 47	5cm 70*	10cm 70	20cm --	myélite / nécrose
estomac	60	55.0	50	70	67	65	perforation / ulcération
ATM et mandibule	65	60	60	77	72	72	trismus
queue de cheval	--	--	60	--	--	75	neuropathie clinique
plexus brachial	62	61	60	77	76	75	neuropathie clinique
tête et col fémoral	--	--	52	--	--	65	nécrose
cristallin	--	--	10	--	--	18	cataracte nécessitant intervention
nerf optique	--	--	50	--	--	65	cécité
chiasma optique	--	--	50	--	--	65	cécité
rétine	--	--	45	--	--	65	cécité
rectum	--	--	60	--	--	80	rectite sévère / nécrose / sténose / fistule
côtes	50	--	--	65	--	--	fracture pathologique
parotide	--	32	32	--	46	46	xérostomie
thyroïde	--	--	45	--	--	80	thyroïdite clinique

Tableau 1 : TD5/5 et TD 50/5 des principaux OAR d'après (19)

Ce seuil de 5% de toxicité « acceptée » signifie que pour une majorité de patients il existe une bonne marge de sécurité dans la prescription et la réalisation de leur RT. Néanmoins, cette marge de sécurité peut être totalement annihilée par des écarts significatifs de dose et/ou de volume par rapport à la prescription. Ces circonstances particulières, considérées comme des malfaçons accidentelles, constituent, compte tenu de la complexité croissante des traitements et de leurs moyens de réalisation, une piste importante et obligatoire d'optimisation qui passe par l'assurance qualité des traitements.

Cette introduction générale a pour objectif de définir et poser les problématiques individuelles et communautaires des toxicités tissulaires consécutives à la RT, d'en rappeler les mécanismes physiopathologiques et de poser les bases :

- d'une part de l'introduction **d'une nouvelle approche physique** limitant considérablement les volumes de tissus sains irradiés - l'hadronthérapie ;
- et, d'autre part, l'usage de **tests prédictifs de la radiosensibilité individuelle** afin de proposer à chaque patient une RT dans des conditions de sécurité plus ambitieuse que les 5% de risques acceptés ; frange de toxicité où l'on peut raisonnablement penser que se regroupe la minorité de patients anormalement radiosensibles

1. Les toxicités tissulaires observées après RT

Dès 1936, Holthusen reconnut que la probabilité de "contrôle tumoral non compliqué" augmentait avec la dose appliquée mais diminuait ensuite au delà d'une dose "optimale" du fait de l'apparition de toxicités avec une fréquence et une sévérité croissantes avec la dose (20).

1.1. L'index thérapeutique: définitions et paradigmes actuels

En pharmacologie, l'index thérapeutique pour un principe actif représente le rapport entre son efficacité et sa toxicité, il est défini par le rapport :

$$IT = DL_{50} / DE_{50}$$

Où la dose létale 50 (DL_{50}), est la dose du principe actif produisant la mort chez 50 % des individus et la dose efficace 50 (DE_{50}) est la dose nécessaire pour produire les effets désirés chez 50 % des individus.

Un médicament n'est utilisable que si l'IT est supérieur à 1 et n'est d'usage sûr que si l'IT est très supérieur à 1. Il peut dépasser 100 ou 1000 pour certains médicaments.

La même approche peut être appliquée à la RT, supposant de connaître a priori la dose permettant de stériliser une tumeur et celle générant une toxicité avec une probabilité similaire.

Idéalement le rapport efficacité-toxicité d'une RT devrait être connu et optimisé au moment de l'approbation d'un plan de traitement. En effet il n'existe aucune radiation ni aucune technique permettant de déposer la totalité de la dose de manière exclusive et ciblée à la tumeur (*Gross Target Volume*, GTV) tout en épargnant entièrement les tissus sains avoisinants. En effet l'irradiation à dose efficace d'un volume minimal de tissus sains est justifiée par l'infiltration microscopique par la tumeur invisible sur les examens d'imagerie définissant le *Clinical Target Volume* (CTV). Il est également important de considérer les mouvements qui peuvent animer les organes dans lesquels se développe la tumeur, justifiant une prise de marge supplémentaire afin d'irradier la totalité de la trajectoire de la tumeur (*Internal Margin*, IM). Le repositionnement du patient entre chaque séance de traitement n'est pas non plus exactement reproductible motivant l'ajout d'une nouvelle marge (*Setup Margin*, SM). La somme de ces dernières marges autour du CTV définit le *Planning Target Volume* ou PTV, sur lequel le traitement est généralement prescrit (Figure 1). Enfin, les radiations utilisées produisent une pénombre plus ou moins large dans laquelle le gradient de dose peut varier de façon importante justifiant ainsi une prise de marge supplémentaire afin qu'au moins 95% du PTV soit couvert. Chaque traitement nécessite donc d'optimiser au mieux ce rapport bénéfice–risque contribuant au service médical rendu.

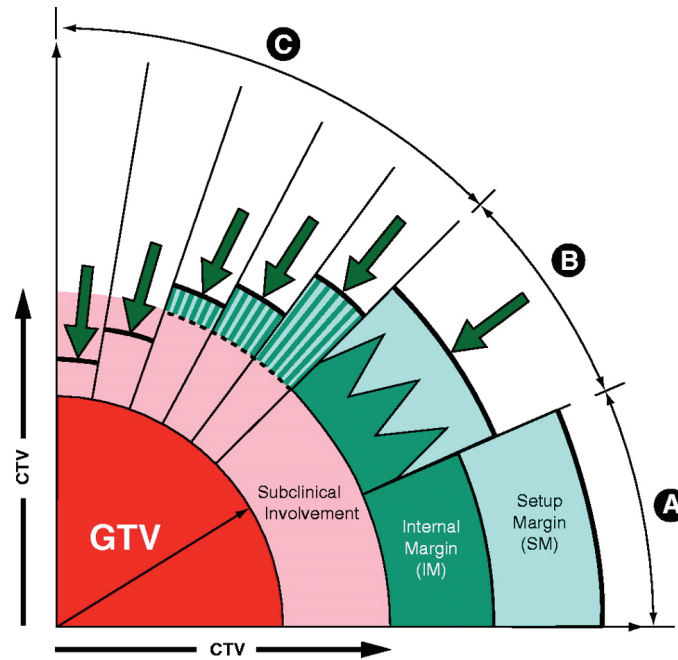


Figure 1: Représentation des concepts de volumes en RT; les flèches symbolisent l'influence que peut avoir le contourage des OAR sur celle du PTV selon la priorité donnée par le radiothérapeute; source ICRU

1.1.1. Dose de contrôle tumoral

La dose de contrôle tumoral est une définition phénoménologique : c'est la dose nécessaire pour obtenir dans 90 % des cas la stérilisation locale définitive de la tumeur (habituellement au terme de 5 ans de surveillance) avec ou sans disparition complète de sa signature morphologique (en effet un reliquat fibrosé peut parfois persister sans reprise évolutive). Cette dose de contrôle tumoral est connue empiriquement et dépend de plusieurs facteurs :

- le type histologique : l'expérience montre que certains types histologiques de tumeur nécessitent des doses plus ou moins fortes pour que la lésion soit stérilisée : c'est notamment le fait de leur radiosensibilité intrinsèque même si d'autres facteurs (ex : vascularisation) sont impliqués. Le facteur le plus limitant est la tolérance des tissus sains qui empêche habituellement d'atteindre les doses de 80 ou 90 Gy qui permettraient de stériliser la grande majorité des tumeurs ;
- le volume : plus une tumeur est volumineuse, plus la dose nécessaire pour la stériliser est importante. Inversement les petites tumeurs nécessitent des doses plus faibles. Ceci est dû au fait que l'irradiation agit de manière probabiliste avec pour

conséquence une influence du nombre de cellules à détruire sur la dose totale nécessaire. Pour stériliser après chirurgie des lésions résiduelles infra cliniques, des doses de 45 à 60 Gy sont généralement suffisantes. De ce point de vue, il est important de distinguer la dose à appliquer à la tumeur macroscopique, GTV, qui pour les carcinomes varie selon le volume entre 60 et 80 Gy et la dose à appliquer aux lésions infra cliniques microscopiques, CTV, qui varie entre 45 et 60 Gy selon le type de cancer ;

- l'aspect de la tumeur : les lésions végétantes nécessitent des doses plus faibles que les tumeurs infiltrantes ou nécrotiques, sans doute parce que les cellules des premières sont mieux vascularisées, donc mieux oxygénées et donc potentiellement plus radiosensibles que les secondes. Cette notion se rapproche de celle de «volume cible biologique» (BTV) objectivé par l'imagerie fonctionnelle. L'imagerie TEP permet par exemple de définir au sein du GTV des zones ayant des activités métaboliques différentes qui pourraient être corrélées à leur radiosensibilité.

1.1.2. Dose de tolérance des organes à risque

1.1.2.1. Les organes à risque

En contrepoint de la dose de contrôle tumoral, on peut définir la dose de tolérance des organes sains situés au voisinage de la tumeur, souvent appelés organes à risque (OAR). La connaissance et le respect de cette dose de tolérance sont donc fondamentaux lors de la planification d'un traitement.

Il existe des organes très radiosensibles (cristallin, ovaire, testicule), d'autres moyennement radiosensibles (intestin grêle, cœur, poumon) et d'autres enfin peu radiosensibles (os, muscle, gros vaisseaux). Par ailleurs, certains organes assurent des fonctions vitales et doivent donc impérativement rester fonctionnels après irradiation (tronc cérébral, moelle, poumon, cœur), alors que d'autres assurent des fonctions non vitales mais dont la préservation permet de maintenir la qualité de vie après le traitement (glandes salivaires, intestin, œil, os).

Certaines conditions pathologiques peuvent rendre les organes plus sensibles aux rayonnements, notamment le diabète ou des affections génétiques (ataxie télangiectasie) que l'on discutera plus loin. L'âge peut intervenir si l'organe est en croissance, notamment chez le jeune enfant. Enfin, les thérapeutiques associées, en

particulier les chimiothérapies, les biothérapies ciblées, voire la chirurgie, peuvent entraîner des modifications significatives de ces doses de tolérance. Ces associations thérapeutiques et leurs effets secondaires doivent être pris en compte dans le choix des indications et des doses.

1.1.2.2. Structures des organes à risque et leurs conséquences

La plupart des OAR sont constitués de plusieurs types de tissus, certains à réactions précoces, d'autres à réactions tardives. Au début du XX^{ème} siècle, la vitesse de renouvellement des tissus fut au centre de la physiopathologie des réactions avec la loi dite de Bergonié et Tribondeau (1906) (21). Cette loi n'est pas totalement exacte mais sa simplicité l'a rendue très populaire. Il nous a donc paru nécessaire de reconsidérer cette loi dans son contexte historique à travers une publication qui fait partie de cette thèse (voir Annexe 2.2).

En dehors de cette loi, la tolérance globale à l'irradiation d'un organe doit donc nécessairement prendre en compte les différents tissus qui le composent : par exemple, l'œsophage comporte une muqueuse (tissu à renouvellement rapide) responsable d'œsophagite aiguë en cours d'irradiation, et des tissus conjonctifs de soutien (tissu à renouvellement lent) qui peuvent entraîner une fibrose et une sténose radique tardive.

Par ailleurs, la tolérance fonctionnelle des organes à l'irradiation dépend de leur capacité à continuer à fonctionner comme entité, et donc de leur architecture fonctionnelle. Chaque organe est considéré comme étant constitué de sous-unités avec une organisation particulière :

- tissus avec structure en série (moelle épinière, tube digestif, nerfs) : la destruction d'une sous-unité de l'organe altère toute la fonction de cet organe.
- tissus avec structure en parallèle (poumon, rein, foie, parotide) : l'organe est constitué de sous-unités indépendantes entre elles. La fonction de l'organe est altérée lorsqu'un certain nombre de sous-unités sont détruites. L'organe dans son ensemble est très sensible à l'irradiation mais une dose élevée, voire très élevée, dans un petit volume est tolérable.

1.1.3. Effets précoces et effets tardifs

La pratique et la longue expérience de la RT a permis de distinguer les réactions tissulaires de façon empirique en fonction de leur temps d'apparition après la RT : on parle alors d'effets précoces et d'effets tardifs :

- Les effets dits « précoces » surviennent généralement pendant ou dans les six mois suivant la RT; ils intéressent plus volontiers les tissus à renouvellement rapide (muqueuses, moelle osseuse ainsi que les tumeurs malignes) et disparaissent avec la reconstitution des tissus irradiés. Ce caractère transitoire explique qu'ils soient aussi souvent qualifiés d'effets aigus. Ils sont directement liés à une déplétion par mort radio induite des cellules épithéliales rapidement prolifératives, aboutissant à une perte transitoire de la fonction de ces épithélia (perméabilité, surinfection, malabsorption, pertes hydrosodées et protéiques, insuffisance hématopoïétique, alopecie, etc.) (22).

- Les effets dits « tardifs » sont caractérisés par une latence clinique pendant laquelle des évènements cellulaires et tissulaires intriqués se mettent en place. Ils se manifestent ainsi symptomatiquement plus de 3 mois après la fin de la RT dans les tissus à renouvellement lent. Il peut produire divers aspects anatomo-pathologiques: occlusions, sténoses, fibrose, nécrose, neurodégénérescence, atrophie, microangiopathie, hyposécrétion endocrinienne... pouvant se décliner pour tous les organes et tissus, et engendrant une perte de fonction souvent irréversible (23). Ceci impose leur prévention par le respect des limites de dose recommandées aux OAR. Parfois ils peuvent survenir sur un lit d'effets précoces sévères (*consequential late effects*) (24). Ils ont les mêmes déterminants radiobiologiques que les effets précoces. Toute escalade de dose peut donc s'accompagner en théorie d'une majoration du risque de CLE. Un bon exemple est le cancer de la prostate (25).

Une conséquence fondamentale de toutes ces notions est qu'une même dose physique d'irradiation peut avoir des conséquences tissulaires très différentes selon des paramètres intrinsèques et extrinsèques que nous étudierons plus loin.

1.1.4. Effets déterministes ou stochastiques ?

Dans le cadre des recommandations internationales de radioprotection sont définies les notions d'effets déterministes et stochastiques essentiellement basées sur l'observation épidémiologique de ces effets.

En particulier un effet est dit déterministe si la relation entre sa survenue et sa gravité en fonction de la dose est connue (un seuil de dose peut généralement être défini). Il peut être précoce (ex : syndrome d'irradiation aigue) ou tardif (ex : effets tératogènes). Le caractère déterministe rend la prédiction individuelle de l'effet possible : par exemple, la radiodermite aiguë survient dès 12 Gy chez les patients à phototype clair et se complique de radiodermite exsudative à partir de 40 Gy.

A l'inverse, l'incidence, mais pas la gravité, d'un effet stochastique augmente avec la dose reçue mais selon une loi qui n'est pas forcément linéaire et qui fait intervenir certaines probabilités, principalement parce que son origine est multifactorielle. Les cancers radio induits sont généralement donnés comme des exemples d'effet stochastiques.

Cependant, ces définitions ont été proposées pour des individus considérés comme normaux (donc radiorésistants) et à faible risque de cancer. Le débat actuel sur la non linéarité des effets des faibles doses de radiation et l'introduction du facteur individuel tant dans la survenue d'effets tissulaires (radiosensibilité) que de cancers radio induits (radioesthésie) rend la réalité plus complexe. Il existe en effet aujourd'hui une réelle confusion entre le degré de connaissance que l'on a de la relation dose-effet et sa véritable nature déterministe ou stochastique si tous les paramètres qui la régissent étaient connus. De plus, les augmentations de risques liés à la génétique peuvent rendre une relation dose-effet plus probable qu'en l'absence de tout facteur de risque. Pour toutes ces raisons, afin d'établir cette thèse en dehors de toute influence ou paradigme qui ne serait pas justifié, nous avons délibérément choisi de ne pas s'exprimer en termes déterministes ou stochastiques.

1.1.5. Conclusion préliminaire

Contrairement à la chimiothérapie, peu d'études prospectives systématiques sur les effets causés par l'escalade de dose en RT ont été réalisées chez l'homme en vue

de déterminer les doses maximales tolérées par les organes. Ces études sont d'ailleurs de réalisation difficile voire impossible puisque la plupart des effets à prendre à compte sont tardifs et potentiellement irréversibles. Ainsi les doses maximales recommandées dérivent essentiellement de l'expérience clinique accumulée depuis plus d'un siècle de RT, des données in vivo chez l'animal et d'études rétrospectives chez les patients (Tableau 2).

On peut donc s'interroger sur la validité des paradigmes actuels et nous avons résolu de mieux comprendre la démarche historique qui a abouti à toutes ces définitions à travers le paragraphe suivant.

1.2. L'index thérapeutique : de la démarche historique aux pratiques actuelles

Bien que les effets tissulaires des radiations ont été les premiers décrits, ils ont longtemps été sous évalués voire négligés depuis la découverte de leur effet anti tumoral. Ce constat peut s'expliquer par la recherche d'une efficacité "à tout prix" qui a été longtemps promue par la communauté médicale, mais également un manque d'outils d'évaluation et la difficulté d'éviter ces toxicités avec l'état des connaissances et de la technologie.

Les premières observations d'efficacité thérapeutique du radium furent publiées par deux Allemands, Otto Walkhoff et Friedrich Giesel en 1900 concernant le traitement de la peau.

Henri Becquerel, découvreur de la radioactivité, fut en parallèle le premier à documenter une toxicité radique lorsqu'il décrivit l'érythème puis l'ulcération qu'il présenta sur son torse après qu'il eût accidentellement oublié une source de radium dans la poche intérieure de sa veste. Pierre Curie expérimenta intentionnellement ces effets en appliquant sur son avant-bras une source de radium (26).

De nombreux articles décrivant les toxicités radiques extra cutanées suivirent bientôt. En 1911, Von Jagic rapporta le premier cas de leucémie radio induite professionnelle (27). A la fin des années 1920, il apparut évident que des recommandations de radioprotection étaient nécessaires. En 1925, les radiothérapeutes et les radiologues

ont créé la *Commission Internationale de Protection contre les Rayonnements* (C.I.P.R.) pour étudier et maîtriser au mieux les risques des rayonnements.

Henri Coutard et Claudius Regaud développèrent ensuite leur théorie du fractionnement pour protéger les tissus sains à renouvellement lent, théorie qui s'opposait à l'approche allemande d'augmenter la dose et de réduire le nombre de fractions (28). Du fait de la faible énergie des rayons X (150 à 300 kV, kilo voltage) utilisés avant les années 60, la dose maximale était délivrée à la peau et le rendement en profondeur était faible (environ 50% de la dose à 7 cm de profondeur), la toxicité cutanée précoce était donc le facteur limitant des premières RT. De plus, il existait une grande incertitude sur les doses délivrées et les volumes irradiés. Dans les années 1960, avec l'avènement du Télécobalt puis des hautes énergies (méga voltage) et d'une métrologie dosimétrique plus précise, l'assurance et le contrôle de qualité prenaient une place essentielle dans la réflexion des oncologues radiothérapeutes. La dose totale appliquée était désormais dépendante de la tolérance des organes à risque plus profonds, adjacents à la tumeur et irradiés de manière partielle et inhomogène. En parallèle, de plus en plus de patients survivaient à leur cancer ce qui permit d'observer l'apparition des toxicités tardives (29). Les radiothérapeutes se concentrèrent assez rapidement sur le recensement des toxicités. Dans les années 1970, une modélisation de la probabilité de complication tissulaire (NTCP), basée sur les données publiées et l'expérience introduisit les concepts de TD5/5 et TD50/5 (dose entraînant un risque de complication de 5% et 50%, respectivement, dans les 5 ans suivant la RT) (30).

Dans les années 80 et 90, les développements de l'informatique et de l'imagerie 3D rendirent possibles la prédiction de la probabilité et de la sévérité des toxicités ainsi que la documentation précise des données dose-volume pour des cours de plans de traitement de plus en plus complexes avec une distribution de dose toujours plus adaptée à la cible et donc inhomogène dans le volume irradié. L'histogramme dose-volume cumulatif (HDV) permet une représentation graphique de la distribution inhomogène de la dose dans le volume d'un organe avec en ordonnée le pourcentage de volume de l'organe recevant plus que le niveau de dose donné en abscisse (31) (Figure 2). C'est actuellement la façon la plus complète de décrire la dose reçue par un OAR. Il est cependant dénué d'information anatomique et dépend

d'une équivalence biologique entre une irradiation hétérogène et une irradiation homogène.

Un degré de précision supplémentaire a été apporté par le concept d'architecture fonctionnelle des OAR (33):

- organes en série : une dose élevée sur un petit volume est toxique, la limite de dose de tolérance est représentée par la dose maximale (Dmax).

- organes en parallèle : la dose de tolérance dépend de la distribution de dose au sein de l'organe et donc du pourcentage du volume d'organe irradié. Dans de cas, la dose de tolérance devient une fonction continue du volume dont on utilise des valeurs typiques ou remarquable en pratique clinique (ex. $V_{20Gy} < 30\%$ du volume pour les poumons, etc.)

Les études d'irradiation partielle d'OAR chez l'animal ont cependant pointé les insuffisances de l'analyse isolée des HDV pour prédire la toxicité radique notamment parce que la distribution des sous-unités fonctionnelles peut être hétérogène dans l'OAR (34).

Pendant les années 1990 puis 2000, les études rétrospectives documentant la toxicité se sont multipliées chez des patients suivis à long terme avec de réels biais d'inter comparaison entre les institutions (35). Des problèmes liés à l'évolution des algorithmes de calcul dosimétrique interviennent aussi rendant très difficile les compilations de résultats sur de longues périodes. En outre, avec le développement de la RT avec modulation d'intensité (RCMI ou IMRT) la dose peut désormais être « sculptée » autour des OAR qui sont irradiés avec des gradients de dose très importants, des doses moyennes nettement plus réduites mais aussi de moins en moins de volume totalement non irradiés, ceci afin de préserver la tolérance et la qualité de vie des patients (36). De plus des facteurs de confusion supplémentaires sont apparus : modifications du fractionnement, traitements médicaux concomitants, etc. Pour tenir compte de ces évolution, de nouveaux modèles physiques NTCP ont du être développés car les approximation des précédents modèles devenaient inacceptables (37).

En 2010, le groupe QUANTEC constitué par le conseil scientifique de l'AAPM (*American Association of Physicists in Medicine*) a publié une méta analyse des données quantitatives cliniques et biologiques (souvent incomplètes, dont de

nombreuses données animales) issues de la littérature sur plus de 30 organes et tissus et obtenues au moyen d'une douzaine de modèles mathématiques (38) (Tableau 2).

Organe à risque	Volume et Dose/Volume	Limite de dose	Dose Max ponctuelle	Prévalence de Toxicité	Critère clinique
Encéphale			<60 Gy	<3%	nécrose symptomatique
Encéphale			72 Gy	5%	nécrose symptomatique
Encéphale			90 Gy	10%	nécrose symptomatique
Tronc cérébral	D _{100%} du volume	<54 Gy		<5%	neuropathie ou nécrose
Tronc cérébral	D _{1-10 cc}	≤59 Gy		<5%	neuropathie ou nécrose
Tronc cérébral			<64 Gy	<5%	neuropathie ou nécrose
Nerf/chiasma optique			<55 Gy	<3%	neuropathie optique
Nerf/chiasma optique			55-60 Gy	3-7%	neuropathie optique
Nerf/chiasma optique			>60 Gy	>7-20%	neuropathie optique
Moelle épinière			50 Gy	0.2%	myélopathie
Moelle épinière			60 Gy	6%	myélopathie
Moelle épinière			69 Gy	50%	myélopathie
Cochlée	moyenne	≤45 Gy		<30%	perte auditive
Parotides (x2)	moyenne	≤25 Gy		<20%	production salivaire à terme <25%
Parotides (x2)	moyenne	≤39 Gy		<50%	production salivaire à terme <25%
Parotide unilatérale	moyenne	≤20 Gy		<20%	production salivaire à terme <25%
Muscles constricteurs pharynx	du moyenne	≤50 Gy		<20%	dysphagie symptomatique
Larynx			<66 Gy	<20%	dysphonie
Larynx	moyenne	<50 Gy		<30%	aspiration
Larynx	moyenne	<44 Gy		<20%	œdème
Larynx	V _{50Gy}	<27%		<20%	œdème
Poumon	V _{20Gy}	≤30%		<20%	pneumopathie symptomatique
Poumon	moyenne	7 Gy		5%	pneumopathie symptomatique
Poumon	moyenne	13 Gy		10%	pneumopathie symptomatique
Poumon	moyenne	20 Gy		20%	pneumopathie symptomatique
Poumon	moyenne	24 Gy		30%	pneumopathie symptomatique
Poumon	moyenne	27 Gy		40%	pneumopathie symptomatique
œsophage	moyenne	<34 Gy		5-20%	œsophagite grade 3+
œsophage	V _{35Gy}	<50%		<30%	œsophagite grade 2+
œsophage	V _{50Gy}	<40%		<30%	œsophagite grade 2+
œsophage	V _{70Gy}	<20%		<30%	œsophagite grade 2+
Cœur (Péricarde)	moyenne	<26 Gy		<15%	péricardite
Cœur (Péricarde)	V _{30Gy}	<46%		<15%	péricardite
Cœur	V _{25Gy}	<10%		<1%	mortalité cardiaque à

					terme
Foie	moyenne	<30-32 Gy		<5%	hépatite (% de la fonction hépatique physiologique)
Foie	moyenne	<42 Gy		<50%	hépatite (% de la fonction hépatique physiologique)
Foie	moyenne	<28 Gy		<5%	hépatite (chez pts Child-A)
Foie	moyenne	<36 Gy		<50%	hépatite (chez pts Child-A)
Reins (x2)	moyenne	<15-18 Gy		<5%	insuffisance rénale clinique
Reins (x2)	moyenne	<28 Gy		<50%	insuffisance rénale clinique
Reins (x2)	V _{12Gy}	<55%		<5%	insuffisance rénale clinique
Reins (x2)	V _{20Gy}	<32%		<5%	insuffisance rénale clinique
Reins (x2)	V _{23Gy}	<30%		<5%	insuffisance rénale clinique
Reins (x2)	V _{28Gy}	<20%		<5%	insuffisance rénale clinique
Estomac	D _{100% du volume}	<45 Gy		<7%	ulcération
Intestin grêle (anses individualisées)	V _{15Gy}	<120 cc		<10%	toxicité grade 3+
Intestin grêle (sac péritonéal)	V _{45Gy}	<195 cc		<10%	toxicité grade 3+
Rectum	V _{50Gy}	<50%		<10%	toxicité grade 3+
Rectum	V _{60Gy}	<35%		<10%	toxicité grade 3+
Rectum	V _{65Gy}	<25%		<10%	toxicité grade 3+
Rectum	V _{70Gy}	<20%		<10%	toxicité grade 3+
Rectum	V _{75Gy}	<15%		<10%	toxicité grade 3+
Vessie (cancer vésical)			<65	<6%	toxicité grade 3+
Vessie (cancer de prostate)	V _{65Gy}	<50%			toxicité grade 3+
Vessie (cancer de prostate)	V _{70Gy}	<35%			toxicité grade 3+
Vessie (cancer de prostate)	V _{75Gy}	<25%			toxicité grade 3+
Vessie (cancer de prostate)	V _{80Gy}	<15%			toxicité grade 3+
Tête fémorale	D _{100% du volume}	<52 Gy		<5%	nécrose, fracture
Bulbe pénien	D _{95% du volume}	<50 Gy		<35%	impuissance
Bulbe pénien	D _{90% du volume}	<50 Gy		<35%	impuissance
Bulbe pénien	D _{60-70% du volume}	<70 Gy		<55%	impuissance

Tableau 2 : Relation dose-volume-effet des principaux OAR, d'après QANTEC (39)

A ce jour, environ 60% des adultes et 80% des enfants survivent à leur cancer à 5 ans (40). Les études de qualité de (sur)vie apparaissent plus que jamais

primordiales. La preuve de l'utilité clinique de la modélisation NTCP n'a pas encore été apportée, notamment à cause de l'absence :

- d'outils et de stratégies pour l'enregistrement systématique des toxicités après RT seule ou combinée ;
- d'une méthodologie rigoureuse d'analyse des effets tardifs avec estimation de l'incertitude de prédiction permettant de comparer les institutions et de compiler les données ;
- d'une prise en compte des facteurs de confusion physiologiques sur les toxicités ;
- d'échelle appropriée et convenablement calibrées séparant les données objectives, les données subjectives relatées par les patients et établissant une pondération quantitative entre toxicité et qualité de vie (ex. échelle EQ5D);
- de bases de données avec accès à la matrice de répartition de dose 3D et en lien avec des biomarqueurs cliniques (exemple : base PEDIART en oncologie pédiatrique) ;
- d'essais cliniques prospectifs testant la performance des modèles ;
- d'une compréhension suffisante des interactions entre le fractionnement et la distribution de dose ;
- d'une intégration de biomarqueurs intermédiaires d'imagerie métabolique (41).

Une partie de ces éléments sera discutée dans le chapitre sur la toxicogénèse en hadronthérapie.

Les atlas d'incidence et de risque des complications représentent une méthodologie intéressante pour comparer les distributions entre les patients et les institutions (42). Ils offrent pour un OAR donné une compilation graphique bidimensionnelle (dose en abscisse, volume en ordonnée) des HDV de l'ensemble des patients suivis suffisamment longtemps, quelle que soit la dose totale délivrée. A chaque nœud, est rapportée l'incidence des toxicités de grade n. Cette dernière peut être déclinée en code couleur pour davantage de lisibilité (Figure 3). En cas de fractionnement modifié, les doses équivalentes biologiques peuvent être rapportées selon le modèle linéaire quadratique de la relation dose – effet en RT si nous nous trouvons dans sa gamme de validité. L'incidence actuarielle peut être déterminée au moyen de courbes de Kaplan Meier. Cet outil centré sur une approche de population ne permet

toutefois pas de réaliser une analyse multi variée, en particulier des facteurs individuels.

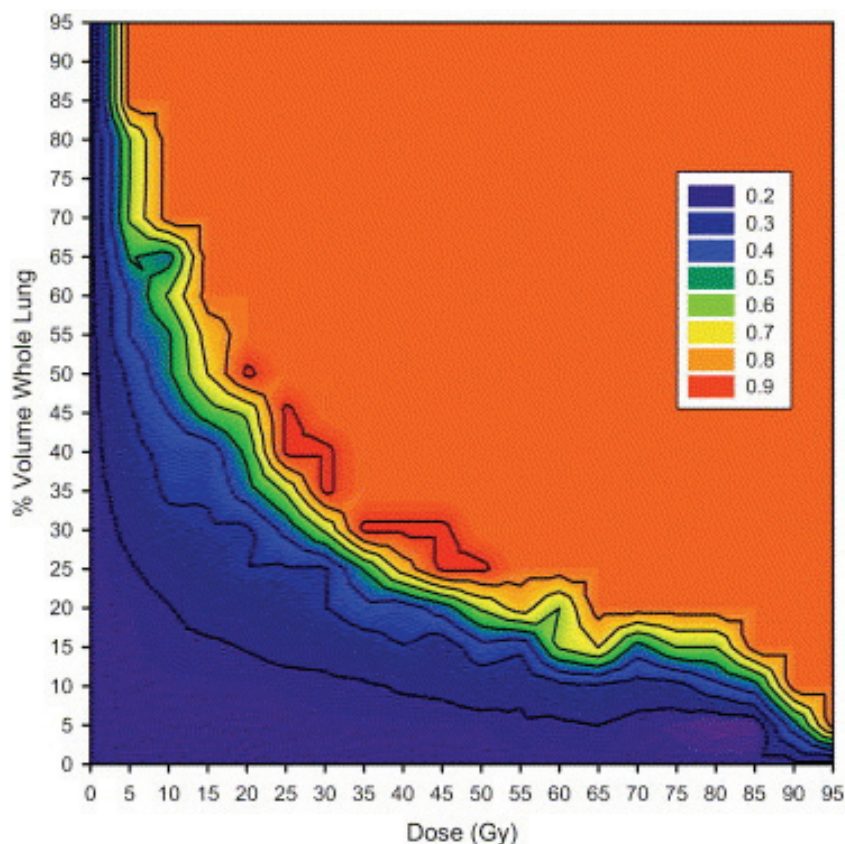


Figure 3 : Taux de complications pulmonaires tardives observées à partir d'une compilation des HDV de patients inclus dans des essais de RT thoracique. Lignes iso taux de complication s'étalant de 0,2 (en bas à gauche) à 0,9 (autour des zones rouges) ; IC_{68%} (42).

L'évaluation thérapeutique centrée sur la toxicité est de développement récent. En effet avec l'amélioration des performances des traitements anti cancéreux, la survie des patients a nettement augmenté. La qualité de cette survie s'avère désormais primordiale. La pédiatrie est une discipline pionnière en ce sens tant les toxicités en particulier tardives peuvent avoir des conséquences physiques, psychologiques, sociales et éducatives délétères.

1.3. Impact physique, psychologique, économique et social des séquelles : la réalité de la morbidité

La morbidité d'une population se définit comme étant le « nombre de personnes malades ou le nombre de cas de maladies dans une population déterminée, à un moment donné ». On distingue habituellement plusieurs types de morbidité :

- une morbidité diagnostiquée qui correspond aux affections diagnostiquées et traitées par le corps médical, chez des individus ayant eu recours à des médecins ;
- une morbidité dite ressentie qui recouvre l'ensemble des affections, des troubles réels tels que les individus les ressentent et les interprètent, dont un sous-ensemble constitue la morbidité déclarée ;
- enfin, la morbidité infra clinique ; ce sont les affections dont on ne peut encore déceler l'existence, faute de signes cliniques ou de moyens d'investigation suffisamment sensibles ;

L'ensemble constitue la morbidité réelle, comprenant la totalité des affections existant chez un individu, connues ou non de lui, diagnostiquées ou non.

Qu'elle soit temporaire ou définitive, la morbidité radio induite expose les patients et la société à un surcoût financier lié à l'utilisation de ressources du système de soins (consommations médicamenteuses, consultations et visites médicales, examens de laboratoires et explorations, hospitalisations, etc.) mais également d'autres secteurs que celui de la santé (administrations publiques : aides ménagère, arrêt de travail/invalidité, soins à domicile...) ou encore incombant au patient ou à sa famille (frais de transport, dépenses d'aménagement du domicile, temps à recevoir des soins, etc.).

Bien que le surcoût lié à la prise en charge des toxicités tardives n'ait jamais été évalué du fait de la complexité des situations et de la multiplicité des paramètres, les conséquences sont majeures dans bien des domaines pour les patients eux-mêmes.

Une cohorte de 20 227 survivants à 5 ans à un cancer pédiatrique a été suivie rétrospectivement (*Childhood Cancer Survivor Study*). Le diagnostic avait été posé entre 1970 et 1986. La surmortalité globale dans cette cohorte était 10,8 fois plus importante que dans la population générale (IC_{95%} : 10,3-11,3). 21,3% des décès étaient imputables à des toxicités tardives dont les cancers secondaires (12,7%)

considérés comme induits par le traitement (43). Ces toxicités sont essentiellement cardiovasculaires, rénales, endocriniennes, musculo squelettiques. Dans une étude sur 9535 adultes ayant survécu à un cancer pédiatrique, 44% ont déclaré souffrir d'une détérioration modérée ou grave de leur état de santé (état général, santé mentale, état fonctionnel, limitation de l'activité, douleur séquellaires, anxiété) L'incidence des complications tardives ne cessait de croître avec la durée du suivi sans atteindre de plateau (44).

L'incidence des séquelles au moins 30 ans après le diagnostic de cancer atteignait une incidence cumulative de 73,4% dans la cohorte du *Childhood Cancer Survivor Study* (45).

Le cas des tumeurs cérébrales pédiatriques s'avère particulièrement frappant. Deux tiers des enfants atteints survivent plus de 5 ans (46). Un grand nombre doit cependant faire face à des séquelles telles qu'endocrinopathies, fatigue chronique, douleurs, épilepsie, incapacités motrices, troubles émotionnels, ou difficultés d'apprentissage qui viennent grever leur qualité de vie (47). En analyse multi variée, le rôle péjoratif joué par la RT encéphalique à une dose supérieure à 30 Gy apparaît majeur (48).

Des structures de soins multidisciplinaires spécialisées dans la prise en charge des survivants au cancer se développent aux Etats Unis. A l'âge adulte, plus de 25% sont sans emploi et/ou jouissent d'un revenu annuel inférieur à 20 000\$ (49). L'impact social, économique et culturel de cette prise en charge est également fort sur les parents et les aidants. Chez l'adulte, le premier rapport de l'Observatoire sociétal des cancers (2012) met en lumière la réalité du vécu des personnes malades, au regard notamment de leurs ressources et des charges, de la vie quotidienne à domicile et des difficultés liées aux séquelles physiques et psychologiques, ainsi que de la vie professionnelle et des conditions de la reprise du travail. Ce rapport souligne que :

- le cancer est une maladie paupérisante, avec des effets aggravés pour les plus vulnérables : arrêt maladie, perte de revenus, invalidité, rupture sociale, isolement psychologique ;
- la vie du malade est jalonnée de nombreuses étapes administratives, souvent vécues comme une double peine.

Les patients qui souffrent de séquelles ou qui ont subi des traitements lourds déclarent le plus souvent avoir fait l'objet de rejet ou de discrimination. Parmi les personnes en activité professionnelle dans les deux ans suivant le diagnostic de cancer, deux tiers se déclarent plus rapidement fatiguées qu'auparavant et ressentent des séquelles physiques et psychologiques de la maladie ou des traitements : gênes dans les mouvements, douleurs, troubles du sommeil, troubles de la mémoire et de la concentration. Elles sont également davantage confrontées aux troubles dépressifs et anxieux que la population générale.

D'après les résultats du dernier baromètre LH2-CISS sur les droits des malades publié en février 2012, 24 % des Français atteints d'une affection de longue durée (ALD) ont été confrontés au refus d'accès au crédit en raison d'un handicap ou d'une maladie (50).

Le Plan Investissements d'Avenir finance **plusieurs cohortes permettant de suivre au long cours des milliers de patients souffrant de cancers** du sein (CANTO) ou pédiatriques (HOPE-EPI), permettant de disposer d'une importante base de données clinico-biologiques sur les toxicités chroniques liées au traitement du cancer. Les données pourraient permettre d'identifier des indicateurs prédictifs de toxicité chronique parallèlement à l'amélioration de la qualité de vie des patients et une diminution des dépenses de santé.

Le Programme Personnalisé de l'Après Cancer (PPAC) a été testé dans les 35 expérimentations du parcours personnalisé, pour permettre un suivi global prenant en compte le risque de second cancer, les séquelles de la maladie et des traitements, leur retentissement sur la qualité de vie, ainsi que les besoins en soins de support (prise en charge de la douleur, diététique, oncopsychologie...). Établi en concertation avec le médecin traitant, le PPAC doit également permettre d'identifier les différents relais sociaux et médicosociaux de proximité. Afin de mieux prendre en compte les situations de handicap des personnes atteintes de cancer en raison de la maladie ou des conséquences des traitements, les coopérations entre équipes de soins et maisons départementales des personnes handicapées (MDPH) ont été expérimentées en 2011 par la CNSA (Caisse nationale de solidarité pour l'autonomie), en partenariat avec l'INCa.

Avec les déficits endémiques touchant l'assurance maladie nous comprenons bien que l'impact de toute nouvelle thérapeutique ne saurait s'apprécier exclusivement en termes d'efficacité. La charge sociétale est ainsi évaluée depuis quelques années au moyen d'outils médico-économiques spécifiques.

1.4. Prise en compte de la toxicité dans l'évaluation des nouveaux traitements

1.4.1. Renouveau des principes d'évaluation

Il est utile de rappeler que les premières phases d'évaluation des traitements innovants - RT comprise - évaluent la tolérance. Le développement des innovations technologiques s'accompagne de surcoûts en hommes et en matériels qui doivent être évalués et mis en balance avec le bénéfice clinique (gain en survie et/ou en tolérance en particulier tardive). La nécessité d'une maîtrise des dépenses de santé commande que toute évolution thérapeutique soit associée à un rapport coût/bénéfice favorable. Le coût de prise en charge du cancer en France, toutes localisations confondues, a été estimé à 17 milliards d'euros, à partir de l'exploitation de la base du Programme de médicalisation du système d'information (PMSI) pour 126 milliards en Europe (51). Notons toutefois que la RT est de loin le traitement le moins coûteux de l'arsenal des thérapeutiques du cancer. Ainsi les dépenses consacrées à la RT seraient inférieures à 10 % du total des dépenses consacrées au cancer.

Face à des ressources limitées et insuffisantes pour financer toutes les stratégies, un arbitrage est devenu nécessaire dans le domaine de la santé et il est apparu que le choix de priorités en matière de politique de santé publique devait se faire en considérant non seulement les conséquences médicales des différentes stratégies mais aussi leurs coûts (coûts générés et coûts évités). L'intérêt de développer des évaluations médico-économiques s'est imposé de façon à pouvoir identifier les stratégies optimales du point de vue de leurs coûts mais aussi de leur bénéfice clinique, avec une importance toute particulière accordée à l'évaluation de l'impact de la maladie et de son traitement sur le fonctionnement physique, psychologique mais aussi social, impliquant des mesures de qualité de vie liée à la santé. Diverses méthodologies peuvent être utilisées en oncologie (52).

Dans le cadre d'une évaluation économique de type coût-efficacité, les coûts des stratégies étudiées (innovante(s) versus standard) sont rapportés à leur efficacité respective (survie, par exemple). En revanche une limite importante de ce type d'approche est le fait que seule l'approche de l'efficacité est mise en relation avec les coûts, sans prendre en compte la notion de toxicité ou plus globalement d'effets sur la qualité de vie de chacune des stratégies évaluées, en un mot, **l'utilité** respective de chaque traitement.

Cependant, l'analyse de l'utilité incorpore un jugement de valeur du patient par rapport au résultat de santé obtenu. Ce résultat générique, habituellement exprimé en **années de vie pondérées par la qualité de vie** (*Quality Adjusted Life Years* — QALYs), est mesuré en ajustant la durée de vie affectée par le résultat de santé, à l'aide des valeurs d'utilité des états correspondants. C'est pour permettre ce type d'analyse qu'il faut disposer d'échelles de qualité de vie calibrées et pondérées comme évoqué précédemment. Les résultats des analyses coût-utilité sont généralement exprimés en coût par année de vie gagnée en bonne santé, c'est-à-dire en coût par QALY gagné. Fonder une décision publique sur des résultats d'étude exprimés en termes de QALY requiert que certaines conditions soient vérifiées et/ou validées du fait de nombreux problèmes tant au niveau méthodologique qu'au niveau philosophique. Il faut définir les indicateurs de vie qui peuvent varier avec le temps et les individus et imposent une conversion monétaire. Il ne faut pas sous-estimer les difficultés pratiques et éthiques à fixer le prix en unités monétaires d'un bénéfice médical.

Des modèles d'analyse décisionnelle sont appelés à servir de plus en plus souvent de façon à évaluer les différentes options possibles sans avoir à réaliser les études cliniques correspondantes. L'histoire naturelle de la toxicogénèse peut ainsi servir à modéliser les conséquences d'une stratégie thérapeutique en utilisant par exemple un modèle de Markov (53). Cette approche, basée sur le même principe que les codes Monte Carlo en physique des particules, permet de simuler le devenir d'un malade au décours d'une décision thérapeutique et de formuler un pronostic sur le résultat à long terme du traitement. Il suppose que les patients se trouvent à chaque instant dans un des différents états de santé possibles (pour notre problématique :

toxicité de grade 0 à 5, décès d'une autre cause). Avec le temps ils peuvent évoluer d'un état à l'autre. Cette transition est caractérisée par une probabilité donnée pendant une période donnée (cycle). La durée totale du modèle correspond à la somme des différents cycles. Le modèle est décliné selon les diverses stratégies comparées.

Aux Etats-Unis, l'évaluation de la qualité de vie des patients a été encouragée par la *Food & Drug Administration* dès 1985 et même fixée comme objectif prioritaire par le *Cancer Therapy Evaluation Program* (CTEP) parallèlement à l'évaluation de la survie. Outre la qualité de vie, d'autres variables subjectives comportementales et cognitives auto évaluables par le patient se sont développées, ajoutant une nouvelle dimension à l'évaluation des traitements. De nouveaux paramètres cliniques, humanistes et économiques firent peu à peu leur apparition. En 2000, le comité *Health Services Research and Outcomes* (HSRO) du RTOG proposa une méthodologie appropriée pour étudier les interactions entre ces paramètres afin d'enrichir les résultats des essais cliniques et de guider le processus décisionnel face à une thérapie innovante. Un modèle basé sur l'auto-évaluation par le patient a été développé en ce sens et appliqué à l'ensemble des études médico-économiques colligées par le RTOG (4) (Figure 4).

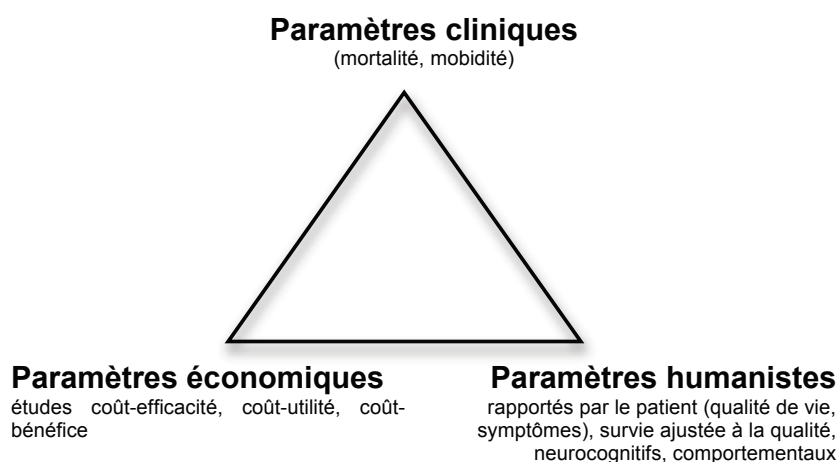


Figure 4 : Méthodologie des études coût-efficacité promue par le RTOG, d'après (4)

En France, le programme de soutien aux techniques innovantes et coûteuses (STIC) a été mis en place par le Ministère de la santé en 2000 pour faciliter la diffusion de prises en charge innovantes sous le regard d'études médico-économiques.

1.4.2. L'exemple des cancers de la prostate

Les cancers prostatiques localisés peuvent être traités avec les mêmes résultats carcinologiques par diverses approches: prostatectomie radicale, curiethérapie interstitielle et RT externe disposant d'un ratio coût-efficacité équivalent (54-56). Ces trois approches ont des spectres de toxicité et un impact en terme de qualité de vie différents (57, 58). L'effet secondaire le plus fréquent de la prostatectomie radicale est l'impuissance immédiate et définitive. L'incontinence urinaire est fréquente au décours immédiat de l'intervention mais demeure accessible à une rééducation. Avec la curiethérapie, le risque d'incontinence urinaire est pratiquement nul. Il y a très peu d'irritation rectale du fait de la très rapide décroissance de dose. Le risque d'impuissance est inférieur à celui observé après RT externe. La RT externe expose quant à elle à un risque de séquelles urinaires et d'impuissance intermédiaires mais surtout à des séquelles digestives, rectales, plus ou moins invalidantes (57) (Tableau 3).

	Impuissance	Séquelles urinaires	Séquelles digestives
Prostatectomie	0,58 (0,44-0,60)	0,15 (0,05-0,25)	0
RT2D	0,31 (0,29-0,36)	0,20 (0,09-0,23)	0,15 (0,08-0,26)
RT3D	0,36 (0,32-0,39)	0,20 (0,09-0,23)	0,05 (0,02-0,12)

Curiethérapie	0,18 (0,04-0,51)	0,14 (0,03-0,30)	0,03 (0,01-0,05)
----------------------	------------------	------------------	------------------

Tableau 3 : Incidence des effets tardifs liés aux traitements des cancers de prostate (59).

La RCMI a permis de réduire l'incidence des toxicités rectales de grade ≥ 2 de 14% à 2% ($p=0,005$) en comparaison avec la RT3D (bilan à 3 ans, dose de 81Gy) (60). Cette différence est encore plus importante lorsqu'une irradiation ganglionnaire pelvienne est nécessaire (61).

Le cancer de la prostate est à notre connaissance le seul domaine dans lequel le coût inhérent à la prise en charge des toxicités tardives a été étudié à partir des données du système d'assurance santé américain *Medicare*. La dilatation d'une sténose de l'urètre était le traitement le plus fréquent pour la toxicité urinaire (3,6% de tous les patients), tandis que la photo coagulation des saignements rectaux était le plus fréquent pour la toxicité digestive (0,8% de tous les patients). La toxicité à long terme et le coût par « patient.année » des principales modalités de traitement du cancer de la prostate diffèrent. La RT3D apparaissait comme le traitement local le plus toxique et plus coûteux dans cette étude incluant des patients traités en 1991 et 2007 (62)(Tableau 4).

Modalités thérapeutiques	n (%)	% avec toxicité urinaire	p	% avec toxicité digestive	p	coût moyen annuel/patient (US\$)	p
Prostatectomie	59 559 (43.3)	6.7	<0.0001	0.1	<0.0001	3205.71	<0.0001
RT3D	60 806 (44.3)	7.1		1.7		6412.29	
Curiethérapie	17 062 (12.4)	3.4		0.3		2557.36	

Tableau 4 : Comparatif des coûts moyens annuels des traitements locaux et de leur complications pour les cancers de la prostate d'après (62).

La RCMI qui pourrait encore améliorer cette statistique expose davantage de volume de tissus sains à de faibles doses de radiations, ce qui peut majorer le risque de cancer radio induit chez les survivants (63), mais dans le cas particulier de la prostate, où l'âge médian au diagnostic est de 74 ans (64), ce risque peut être considéré comme négligeable et place les effets secondaires urinaires et digestifs au tout premier plan.

1.4.3. Echelles d'évaluation de la toxicité tissulaire

L'évaluation de la toxicité est importante mais pourtant rarement ou mal rapportée dans les essais prospectifs. Des scores ont été développés en ce sens. Les échelles de toxicité tardives sont multiples et parfois non concordantes

Un manque de cohérence des critères de cotation et des normes d'enregistrement rend la comparaison des toxicités entre les institutions/publications difficile (65). Le Programme d'évaluation thérapeutique du cancer (CTEP) du *National Cancer Institute (USA)* a développé un système d'évaluation (grading) complet pour les effets indésirables. La première échelle *Common Toxicity Criteria (CTC)* a été publiée en 1983. La version CTC v3.0 fusionna les différentes échelles utilisées précédemment, ce qui offrit plusieurs avantages:

- Il existait des divergences entre les échelles RTOG (Tableaux 5 & 6), EORTC (9), SOMA/LENT (Tableau 7 (66)) et CTC v2.0 ce qui justifiait de proposer une nomenclature commune;
- Les effets secondaires précoces et tardifs étaient auparavant répertoriés dans des échelles différentes. Chaque clinicien peut désormais évaluer les toxicités dans cette échelle unique, indépendamment du facteur temps.
- La nouvelle classification résulte d'un large consensus international validé par les réseaux de recherche clinique et sociétés savantes majeurs : RTOG, EORTC, *l'American College of Surgeons Oncology Group (ACOSOG)*, l'ESTRO et l'ASTRO
- Cette échelle n'est pas spécifique à la RT et peut être également utilisée pour évaluer les effets secondaires des chimiothérapies.
- Son utilisation en routine reste aisée et des applications ont été créées sur smartphone.

Tissue	Grade 1	2	3	4
Skin	Follicular, faint or dull erythema / epilation / dry desquamation / decreased sweating	Tender or bright erythema, patchy moist desquamation / moderate edema	Confluent, moist desquamation other than skin folds, pitting edema	Ulceration, hemorrhage, necrosis
Mucous membrane	Injection / may experience mild pain not requiring analgesic	Patchy mucositis that may produce an inflammatory serosanguinous discharge // may experience moderate pain requiring analgesia	Confluent fibrinous mucositis // may include severe pain requiring narcotic	Ulceration, hemorrhage or necrosis
Eye	Mild conjunctivitis w/ or w/o scleral injection / increased tearing	Moderate conjunctivitis w/ or w/o keratitis requiring steroids and/or antibiotics / dry eye requiring artificial tears / iritis with photophobia	Severe keratitis with corneal ulceration / objective decrease in visual acuity or in visual fields / acute glaucoma / panophthalmitis	Loss of vision (uni or bilateral)
Ear	Mild external otitis with erythema, pruritus secondary to dry desquamation not requiring medication. Audiogram	Moderate external otitis requiring topical medication / serous otitis media / hypoacusis on testing only	Severe external otitis with discharge or moist desquamation / symptomatic hypoacusis / tinnitus, not drug related	Deafness

	unchanged from baseline			
Salivary gland	Mild mouth dryness / slightly thickened saliva / may have slightly altered taste such as metallic taste / these changes not reflected in alteration in baseline feeding behavior, such as increased use of liquids with meals	Moderate to complete dryness / thick, sticky saliva / markedly altered taste	(none)	Acute salivary gland necrosis
Pharynx & esophagus	Mild dysphagia or odynophagia / may require topical anesthetic or non-narcotic analgesics / may require soft diet	Moderate dysphagia or odynophagia / may require narcotic analgesics / may require puree or liquid diet	Severe dysphagia or odynophagia with dehydration or weight loss > 15% from pretreatment baseline requiring NG feeding tube, IV fluids, or hyperalimentation	Complete obstruction, ulceration, perforation, fistula
Larynx	Mild or intermittent hoarseness / cough not requiring antitussive erythema of mucosa	Persistent hoarseness but able to vocalize / referred ear pain, sore throat, patchy fibrinous exudate or mild arytenoid edema not requiring narcotic / cough requiring antitussive	Whispered speech, throat pain or referred ear pain requiring narcotic / confluent fibrinous exudate, marked arytenoid edema	Marked dyspnea, stridor or hemoptysis with tracheostomy or intubation necessary
Upper GI	Anorexia with ≤ 5% weight loss from pretreatment baseline / nausea not requiring antiemetics abdominal discomfort not requiring parasympatholytic drugs or analgesics	Anorexia with ≤ 15% weight loss from pretreatment baseline / nausea and/or vomiting requiring antiemetics / abdominal pain requiring analgesics	Anorexia with > 15% weight loss from pretreatment baseline or requiring NG tube or parenteral support. Nausea and/or vomiting requiring tube or parenteral support / abdominal pain, severe despite medication / hematemesis or melena / abdominal distention (flat plate radiograph demonstrates distended bowel loops)	Ileus, subacute or acute obstruction, perforation, GI bleeding requiring transfusion / abdominal pain requiring tube decompression or bowel diversion
Lower GI / Pelvis	Increased frequency or change in quality of bowel habits not requiring medication / rectal discomfort not requiring analgesics	Diarrhea requiring parasympatholytic drugs (e.g. Lomotil) / mucous discharge not necessitating sanitary pads / rectal or abdominal pain requiring analgesics	Diarrhea requiring parenteral support / severe mucous or blood discharge necessitating sanitary pads / abdominal distention (flat plate radiograph demonstrates distended bowel loops)	Acute or subacute obstruction, fistula or perforation; GI bleeding requiring transfusion; abdominal pain or tenesmus requiring tube decompression or bowel diversion
Lung	Mild symptoms of dry cough or dyspnea on exertion	Persistent cough requiring narcotic, antitussive agents / dyspnea with minimal effort but not at rest	Severe cough unresponsive to narcotic antitussive agent or dyspnea at rest / clinical or radiological evidence of acute pneumonitis / intermittent oxygen or steroids may be required	Severe respiratory insufficiency / continuous oxygen or assisted ventilation
Genitourinary	Frequency of urination or nocturia twice pretreatment habit / dysuria, urgency not requiring medication	Frequency of urination or nocturia that is less frequent than every hour. Dysuria, urgency, bladder spasm requiring local anesthetic (e.g. Pyridium)	Frequency with urgency and nocturia hourly or more frequent / dysuria, pelvic pain or bladder spasm requiring regular, frequent narcotic / gross hematuria with/without clot passage	Hematuria requiring transfusion / acute bladder obstruction not secondary to clot passage, ulceration, or necrosis
Heart	Asymptomatic but objective evidence of EKG changes or pericardial abnormalities without evidence of other heart disease	Symptomatic with EKG changes and radiological findings of congestive heart failure or pericardial disease / no specific treatment required	Congestive heart failure, angina pectoris, pericardial disease responding to therapy	Congestive heart failure, angina pectoris, pericardial disease, arrhythmias not responsive to nonsurgical measures
CNS	Fully functional status (i.e. able to work) with minor neurological findings, no medication needed	Neurological findings present sufficient to require home care / nursing assistance may be required / medications including steroids/antiseizure agents may be required	Neurological findings requiring hospitalization for initial management	Serious neurological impairment that includes paralysis, coma, or seizures > 3 per week despite medication / hospitalization required
WBC Platelets Neutrophils Hgb / Hct	3.0 - < 4.0 75 - < 100 1.5 - < 1.9 11 - 9.5 (28% - < 32%)	2.0 - < 3.0 50 - < 75 1.0 - < 1.5 < 9.5 - 7.5 (< 28%)	1.0 - < 2.0 25 - < 50 0.5 - < 1.0 < 7.5 - 5.0 (Packed cell transfusion required)	< 1.0 < 25 or spontaneous bleeding < 0.5 or sepsis (none)

Tableau 5 : Echelle de toxicité précoce du RTOG, version US (1995)

Tissue	Grade 1	2	3	4
Skin	Slight atrophy; pigmentation change; some hair loss	Patch atrophy; moderate telangiectasia; total hair loss	Marked atrophy; gross telangiectasia	Ulceration
Subcutaneous tissue	Slight induration (fibrosis) and loss of subcutaneous fat	Moderate fibrosis but asymptomatic; slight field contracture; <10% linear reduction	Severe induration and loss of subcutaneous tissue; field contracture > 10% linear measurement	Necrosis
Mucous membrane	Slight atrophy and dryness	Moderate atrophy and telangiectasia; little mucous	Marked atrophy with complete dryness	Ulceration
Salivary glands	Slight dryness of mouth; good response on stimulation	Moderate dryness of mouth; poor response on stimulation	Complete dryness of mouth; no response on stimulation	Fibrosis
Spinal cord	Mild L'Hermitte's syndrome	Severe L'Hermitte's syndrome	Objective neurological findings at or below cord level treated	Mono, para quadraplegia
Brain	Mild headache; slight lethargy	Moderate headache; great lethargy	Severe headache; severe CNS dysfunction (partial loss of power or dyskinesia)	Coma
Eye	Asymptomatic cataract; minor corneal ulceration or keratitis	Symptomatic cataract; moderate corneal ulceration; minor retinopathy or glaucoma	Severe keratitis; severe retinopathy or detachment	Panophthalmitis / blindness
Larynx	Hoarseness; slight arytenoid edema	Moderate arytenoid edema; chondritis	Severe edema; severe chondritis	Necrosis
Lung	Asymptomatic or mild symptoms (dry cough); slight radiographic appearances	Moderate symptomatic fibrosis or pneumonitis (severe cough); low grade fever; patchy radiographic appearances	Severe symptomatic fibrosis or pneumonitis; dense radiographic changes	Severe respiratory insufficiency / Continuous oxygen / assisted ventilation
Heart	Asymptomatic or mild symptoms; transient T wave inversion & ST changes; sinus tachy > 110 (at rest)	Moderate angina on effort; mild pericarditis; normal heart size; persistent abnormal T wave and ST changes; low ORS	Severe angina; pericardial effusion; constrictive pericarditis; moderate heart failure; cardiac enlargement; EKG abnormalities	Tamponade / severe heart failure; severe constrictive pericarditis
Esophagus	Mild fibrosis; slight difficulty in swallowing solids; no pain on swallowing	Unable to take solid food normally; swallowing semisolid food; dilatation may be indicated	Severe fibrosis; able to swallow only liquids; may have pain on swallowing; dilatation required	Necrosis / perforation fistula
Small/Large intestine	Mild diarrhea; mild cramping; bowel movement 5 times daily; slight rectal discharge or bleeding	Moderate diarrhea and colic; bowel movement > 5 times daily; excessive rectal mucus or intermittent bleeding	Obstruction or bleeding, requiring surgery	Necrosis / perforation fistula
Liver	Mild lassitude; nausea, dyspepsia; slightly abnormal liver function	Moderate symptoms; some abnormal liver function tests; serum albumin normal	Disabling hepatic insufficiency; liver function tests grossly abnormal; low albumin; edema or ascites	Necrosis / hepatic coma or encephalopathy
Kidney	Transient albuminuria; no hypertension; mild impairment of renal function; urea 25-35 mg/dL; creatinine 1.5-2.0 mg/dL; creatinine clearance > 75%	Persistent moderate albuminuria (2+); mild hypertension; no related anemia; moderate impairment of renal function; urea > 36-60; creatinine clearance 50-74%	Severe albuminuria; severe hypertension; persistent anemia (< 10); severe renal failure; urea > 60; creatinine > 4.0; creatinine clearance < 50%	Malignant hypertension; uremic coma; urea > 100
Bladder	Slight epithelial atrophy; minor telangiectasia (microscopic hematuria)	Moderate frequency; generalized telangiectasia; intermittent macroscopic hematuria	Severe frequency & dysuria; severe telangiectasia (often with petechiae); frequent hematuria; reduction in bladder capacity (<150 cc)	Necrosis/contracted bladder (capacity < 100 cc); severe hemorrhagic cystitis
Bone	Asymptomatic; no growth retardation; reduced bone density	Moderate pain or tenderness; growth retardation; irregular bone sclerosis	Severe pain or tenderness; complete arrest of bone growth; dense bone sclerosis	Necrosis / spontaneous fracture
Joint	Mild joint stiffness; slight limitation of movement	Moderate stiffness; intermittent or moderate joint pain; moderate limitation of movement	Severe joint stiffness; pain with severe limitation of movement	Necrosis / complete fixation

Tableau 6: Echelle de toxicité tardive du RTOG, version US (1995)

La dernière échelle CTCAE v4.0 (<http://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/>) a été publiée en mai 2009 et contient 765 critères concernant à la fois les effets précoces et tardifs. Ces critères ont été définis selon la nomenclature MedDRA validée cliniquement

dans la plupart des pays. Chaque événement indésirable est défini par ordre de sévérité croissante selon une échelle numérique de 0 à 5 (67):

- Grade 0 : pas de toxicité
- Grade 1 (légère) : n'affecte pas l'activité quotidienne habituelle du patient. Signes ou symptômes ne nécessitant le plus souvent aucun traitement.
- Grade 2 (modérée) : perturbe l'activité quotidienne habituelle du patient. Nécessite le plus souvent un traitement médical ambulatoire sans interruption du traitement par irradiation.
- Grade 3 (sévère) : empêche l'activité quotidienne habituelle du patient. Nécessite un traitement avec hospitalisation et/ou un arrêt du traitement supérieur ou égal à 4 jours.
- Grade 4 (très sévère) : menace le pronostic vital. Impose des mesures de réanimation.
- Grade 5 (décès) : complication mortelle.

Il est à noter que cette échelle combine des signes cliniques objectifs et des signes fonctionnels pour le même organe ce qui peut dégrader la spécificité des études de morbidité (68, 69). Une approche centrée sur la physiopathologie des toxicités et l'auto-évaluation par le patient semble mieux appropriée. Dès la première étude de qualité de vie colligée par le RTOG, il est apparu un désaccord pour les mêmes symptômes entre l'auto-évaluation par le patient et l'évaluation "objective" par le clinicien selon les échelles d'évaluation de la toxicité aiguë RTOG (70). Ceci souligne l'intérêt d'instruments d'auto-évaluation bien conçus avec des questions croisées et soumis à des évaluations psychométriques rigoureuses, ce qui n'est pas encore le cas de la plupart des échelles de toxicité, y compris la CTCAE.

L'échelle SOMA (Subjectif, Objectif, Management, Analytique) LENT apporte une solution à cette problématique bien que rarement utilisée en pratique car moins maniable (71).

Page suivante :

Tableau 7: Exemple de la toxicité mammaire cotée par l'échelle SOMA-LENT

SOMA EVALUATION

CASE # _____

Breast

DATE OF EVALUATION ___/___/___

Page 19

PATIENT NAME: _____

	GRADE 1	GRADE 2	GRADE 3	GRADE 4	SCORING
Subjective Pain	Occasional & minimal Hypersensation , Pruritus	Intermittent & tolerable	Persistent & intense	Refractory & excruciating	_____ <u>Instructions</u>
Objective Edema	Asymptomatic	Symptomatic	Secondary dysfunction		_____ Score the 12 SOM parameters with 1 - 4
Fibrosis* / Fat necrosis	Barely palpable increased density	Definite increased density and firmness	Very marked density, retraction and fixation		_____
Telangiectasia	< 1 cm ²	1 cm ² - 4 cm ²	> 4 cm ²		_____ (Score=0 if there is no toxicity)
Lymphedema, arm (circumference)	2 cm - 4 cm increase	> 4 cm - 6 cm increase	> 6 cm increase	Useless arm, angiosarcoma	_____
Retraction/Atrophy**	10% - 25%	> 25% - 40 %	> 40% - 75%	Whole breast	_____
Ulcer	Epidermal only, = 1 cm ²	Dermal, > 1 cm ²	Subcutaneous	Bone exposed, necrosis	_____
Management Pain	Occasional non-narcotic	Regular non-narcotic	Regular narcotic	Surgical intervention	_____
Edema			Medical intervention	Surgical intervention/ mastectomy	_____
Lymphedema, arm		Elevate arm, elastic stocking	Compression wrapping, intensive physiotherapy	Surgical intervention/ amputation	_____
Atrophy				Surgical intervention/ mastectomy	_____
Ulcer		Medical intervention	Surgical intervention, wound debridement	Surgical intervention/ mastectomy	_____

* Compare exposed area to contralateral non-irradiated skin according to defined parameters ** Volume loss due to surgery +/- or RT. (compared to opposite breast)

SOMA EVALUATION

page ____ of ____

CASE # _____

Breast

DATE OF EVALUATION ____/____/____

Page 20

PATIENT NAME: _____

A lytic Photographs	Assessment of skin changes as atrophy, retraction or fibrosis, ulcer	Y/N Date:
Tape measure	Assessment of breast size and forearm diameter	Y/N Date:
Mammogram	Assessment of skin thickness and breast density	Y/N Date:
CT/MRI	Assessment of breast size, fat atrophy, and fibrosis density	Y/N Date:

page ____ of ____

Par nature, les effets tardifs sont plus difficiles à reconnaître et à évaluer. Les classifications varient dans la gradation de l'amplitude de la sévérité et également pour les critères évalués, de telle sorte qu'une réaction de bas grade dans un système peut être considérée comme de haut grade dans un autre. Il faut enfin noter que la plupart des études de toxicité publiées manquent non seulement d'informations clés, mais sous déclarent fréquemment les événements (72).

Des recommandations pour éviter de tels biais ont été éditées à l'initiative de QUANTEC (18).

1.5. Approches préventives des toxicités

De nombreuses approches dont certaines sont présentées dans la figure 5 sont développées pour améliorer le ratio thérapeutique.

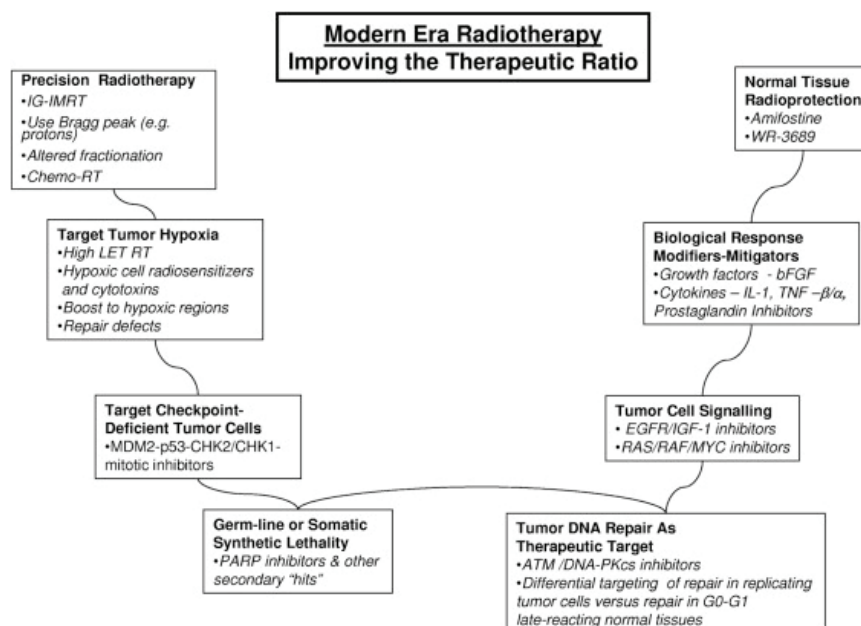


Figure 5: Solutions développées pour améliorer l'index thérapeutique en RT, d'après (6)

Si nous restons dans la problématique des toxicités, nous pouvons envisager les pistes suivantes.

1.5.1. Prévention primaire

Le dépistage des patients radiosensibles au moyen de tests diagnostiques de radiosensibilité individuelle pourrait permettre une adaptation a priori de leur traitement carcinologique. Il serait ainsi possible de recommander une alternative thérapeutique, ou encore d'adapter la dose ou les volumes traités au statut individuel à condition de valider ces modifications dans des essais cliniques de non infériorité. Afin d'améliorer le profil de tolérance, nous pouvons également citer diverses approches physiques, technologiques et biologiques.

L'hyperfractionnement consiste à délivrer une dose par séance inférieure à celle préconisée en fractionnement conventionnel tel que défini par Regaud et Coutard. La dose totale est plus élevée mais la durée totale du traitement ne varie pas. Cet hyperfractionnement a un effet protecteur sur les tissus à renouvellement lent, concernés par les toxicités tardives, à condition d'observer un délai de 4-6 heures entre les fractions (73-77).

Réduire le volume tissulaire irradié à forte dose permet également de réduire l'incidence des toxicités. Les techniques avancées de RT externe, la curiethérapie et l'hadronthérapie répondent à cet objectif comme nous le verrons plus loin (78). La maîtrise des mouvements du patient et des organes pendant ou entre les séances de RT va également dans ce sens grâce au développement de la RT guidée par l'image et de la RT adaptative. Des protocoles d'irradiation partielle des organes sont en cours d'évaluation afin de diminuer le volume tissulaire irradié à forte dose dans des indications sélectionnées notamment dans le cancer du sein et de la vessie (79, 80).

Le pouvoir protecteur des produits contenant des thiols vis-à-vis des lésions radiques des tissus normaux est connu depuis plus de 40 ans (81). L'effet radio protecteur sur les glandes salivaires de l'amifostine chez les patients faisant l'objet d'une irradiation de la sphère ORL a été démontré chez l'homme en 1986 (82). Le mécanisme de protection sélective de l'Amifostine tient à une capture préférentielle et rapide par les tissus sains associée à une capture négligeable ou lente par les tissus tumoraux (83). Plusieurs études cliniques en ont prouvé le bénéfice en terme de tolérance dans cette indication essentiellement (84, 85). L'utilisation de l'amifostine en routine

a été abandonnée dans la plupart des institutions du fait d'effets indésirables sévères conduisant à un arrêt du cytoprotecteur chez ¼ des patients et surtout à une interruption de la RT préjudiciable au contrôle tumoral (86).

1.5.2. Prévention secondaire

Un diagnostic précoce des toxicités s'avère possible lorsque des signes pré- et infra cliniques biologiques ou radiologiques apparaissent. Certains examens sont développés dans cette intention et peuvent renseigner sur la réponse fonctionnelle tissulaire précoce à l'irradiation : PET au Fluorodéoxyglucose (FDG), tomographie d'émission à photon unique (SPECT), imagerie par résonance magnétique (IRM). Ces approches ont été testées dans diverses localisations anatomiques et des biomarqueurs de toxicité précliniques ont été approchés (41). Certains biomarqueurs biologiques sont également étudiés; citons le TGF- β et la KL-6 en prédiction des pneumopathies radiques (87).

Lorsqu'une toxicité précoce inhabituelle se présente en cours de RT, des soins de support spécifiques doivent être instaurés afin de prévenir l'installation de toxicités sévères voire de *Consequential Late Effects*.(88) Les corticoïdes en particulier topiques occupent une place de choix.

Selon l'avancement du traitement du patient et la sévérité de la toxicité, l'irradiation doit être poursuivie, temporairement interrompue (éventuellement avec correction de la prescription pour contrer la repopulation tumorale ou au contraire améliorer la tolérance du traitement restant) ou définitivement arrêtée.

1.5.3. Prévention tertiaire

Lorsqu'une séquelle est identifiée lors du suivi au long cours du patient, des contre-mesures peuvent être instaurées selon la sévérité et l'altération de qualité de vie qui en découle. Certaines peuvent permettre de "désamorcer" l'inflammation chronique profibrosante.

La fibrose radio induite et la radionécrose sont des complications tardives qui sont généralement considérées comme irréversibles. Elles évoluent à bas bruit pendant une période de latence plus ou moins longue. Dans la fibrose radio induite modérée établie, la stratégie de prise en charge actuelle comprend principalement

- (1) les traitements anti-inflammatoires et les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II(89);
- (2) la thérapie vasculaire avec l'oxygène hyperbare(90); et
- (3) les traitements antioxydants type superoxyde dismutase, le tocophérol (vitamine E) combiné de préférence avec la pentoxifylline (91).

Une thérapie cellulaire s'est récemment montrée efficace dans un contexte d'irradiations accidentelles graves, consistant à injecter des cellules souches mésenchymateuses autologues *in situ* (92).

Alors que la réalité des réactions tissulaires spécifiques de la RT est aujourd'hui parfaitement admise, que l'on commence à évaluer au sens médico-social son coût pour les patients et la société, les moyens mis en œuvre pour prévenir et évaluer ces réactions sont encore insuffisants, sans parler de l'information générale du corps médical qui ignore à peu près tout de ces effets.

Tout au plus la formation de base des praticiens en radiobiologie enseigne les possibilités de moduler la réponse tissulaire notamment en modifiant les taux de mort cellulaire. Des outils permettant d'appréhender le concept de radiosensibilité intrinsèque qui en dérive permettent de quantifier les effets de ces facteurs et de comparer différentes conditions de traitement ont été développés au gré de l'évolution des connaissances biologiques.

2. Déterminants des effets tissulaires des radiations

2.1. La radiosensibilité intrinsèque

2.1.1. *Historique et Définition*

Comme on l'a vu plus haut la mort mitotique, l'apoptose et l'arrêt définitif en G1 participent ensemble à la mort radiobiologique. Ces trois types de mort ont au moins un point commun : celui d'aboutir à un arrêt irréversible des capacités de division cellulaire. Ainsi, la mort radiobiologique d'une cellule est définie comme la perte définitive de la capacité de division. Toutefois, avant son éventuelle disparition physique, une cellule peut continuer à métaboliser et notamment à réparer les dégâts créés dans l'ADN (93).

En 1956, Puck et Marcus proposèrent d'utiliser le test des colonies clonogéniques pour quantifier la radiosensibilité : après ensemencement d'un nombre connu de cellules irradiées, la mesure du nombre de colonies (amas macroscopique de cellules survivantes prolifératives après 5-6 générations) formées par les cellules que l'irradiation n'avait pas stérilisées devint la méthode de référence pour évaluer la fraction survivante des cellules (94). Les premiers tests clonogéniques in vivo furent proposés par H.B. Hewitt et C.W. Wilson (95). Les courbes de survie sont établies en représentant dans un graphe semi-logarithmique la relation dose (abscisse) – survie (ordonnée logarithmique) par une série de tests à différentes doses, chacune délivrée en général en une seule fraction (Figure 6).

En 1981, après avoir analysé des centaines de courbes de survie de cellules humaines, Fertil et Malaise aboutirent à trois conclusions (96) :

1. il existe une corrélation quantitative entre l'efficacité du contrôle local in vivo et la radiosensibilité des cellules issues des biopsies de tumeurs, mesurée in vitro par le test clonogénique (96)
2. chacune des tumeurs peut être caractérisée par la survie à 2 Gy (SF2) de la lignée cellulaire représentative. Ils définirent ainsi la notion de radiosensibilité intrinsèque.

3. il existe un continuum dans les valeurs de radiosensibilité des tumeurs : toutes les valeurs sont possibles entre l'hyper radiosensibilité et l'hyper radiorésistance.

La notion de radiosensibilité intrinsèque ne se limite pas aux tumeurs, et la validité des trois conclusions fut démontrée pour les tissus sains. **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 même si aucun essai clinique ne l'a validée.**

En plus de la lourdeur des protocoles expérimentaux, les paramètres qui pouvaient quantifier la radiosensibilité intrinsèque tardèrent à devenir consensuels. Pour faire un bref résumé, parmi tous les modèles de description de la courbe de survie, seul le modèle linéaire quadratique (LQ) présentait l'avantage d'une relative simplicité mathématique et d'une très bonne qualité d'ajustement des courbes expérimentales. Le modèle LQ définit la survie S à une dose D par :

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

où α et β sont des paramètres empiriques d'ajustement dont la signification biologique n'est pas encore définitivement établie. A partir du modèle LQ, Fertil et Malaise définirent la dose moyenne d'inactivation égale à l'intégrale de S en fonction de la dose ou encore à l'aire sous la courbe de survie. Ces paramètres quantifiables aidèrent beaucoup les radiobiologistes dans la comparaison des données expérimentales (Tableau 8).

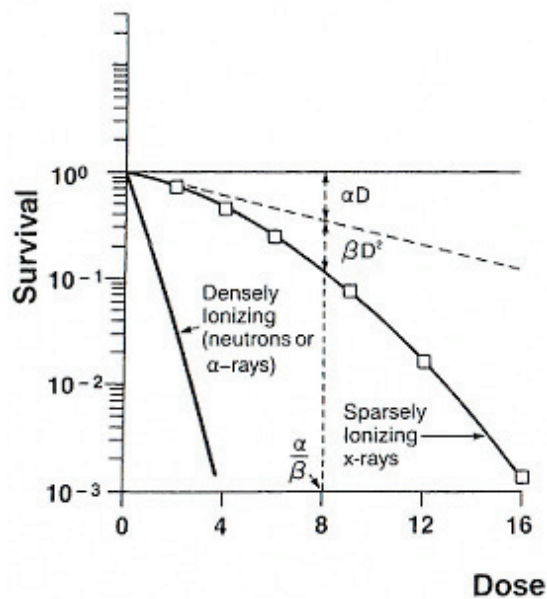


Figure 6 : Forme générique d'une courbe de survie d'une lignée cellulaire de mammifère

	# lignées	Valeurs moyennes des biomarqueurs		
		SF1,5	α	Dmoy
Radiosensibles ^a	38	0,35	0,59	1,45
Intermédiaires ^b	27	0,51	0,39	2,13
Radorésistantes ^c	45	0,55	0,33	2,32

Tableau 8: Biomarqueurs mis en évidence par Fertil et Malaise pour stratifier les lignées cellulaires selon leur radiosensibilité.

^a : lymphomes (n=18), carcinomes en bague à chaton (n=9), neuroblastomes (n=4), médulloblastomes (n=2), myélomes (n=2), carcinomes ovariens (n=2), néphroblastome (n=1).

^b : carcinomes épidermoïdes (n=9), adénocarcinomes lieberkühniens (n=6), carcinomes bronchiques non à petites cellules (n=6), carcinomes vésicaux (n=4), adénocarcinome mammaire (n=1), adénocarcinome pancréatique (n=1).

^c : mélanomes (n=36), glioblastomes (n=5), ostéosarcomes (n=3), tumeur bénigne rénale (n=1), d'après Fertil & Malaise, 1981

Le rapport α/β (exprimé en Gy) évolue de manière inverse à la sensibilité au fractionnement. Il est important de noter que ce paramètre est mesuré in vitro en établissant le rapport de doses iso-effet dans des conditions de culture cellulaire idéales et après application d'une fraction unique. Il peut néanmoins être établi à partir de données expérimentales in vivo ou cliniques mais cela nécessite des expériences complexes impossibles à réaliser chez l'être humain (97, 98).

Ce modèle LQ n'a encore aucune explication biologique satisfaisante; la première explication donnée stipule que destin de la cellule étant relié au devenir des cassures simple- et double-brin (théorie des traces) (99). Toutefois ce modèle, aussi utile soit-il, ne permet pas d'expliquer l'hyper radiosensibilité associée aux faibles doses (100), à l'ataxie télangiectasie ou aux pathologies non associées aux anomalies des

protéines de réparation de l'ADN. En général les tumeurs et tissus sains à renouvellement rapide ont une valeur d' α/β comprise entre 5 et 10 Gy, tandis que les tissus à renouvellement lent, plutôt 1,5 à 4 Gy (101) (Tableau 9).

Tissus à réactions précoces	α/β (Gy)	Tissus à réactions tardives	α/β (Gy)
peau	9-12	rein	2-2,4
jéjunum	6-10	rectum	2,5-5
colon	9-11	poumon	2,7-4
testicule	12-13	vessie	3-7
muqueuses	9-10	SNC (cerveau, moelle)	1,8-2,2

Tableau 9: Valeurs α/β des principaux tissus sains, compilation de données précliniques et cliniques, d'après (102)

2.1.2. Effet du cycle cellulaire

La radiosensibilité des cellules est minimale en phase S et maximale durant les phases G2 et M, durant lesquelles la recombinaison homologue est possible et où la chromatine apparaît condensée. Des recherches se poursuivent depuis plusieurs années pour « synchroniser » les cellules dans les phases sensibles (G2 – M), afin de pouvoir augmenter l'efficacité de l'irradiation. Notons que l'irradiation bloque temporairement les cellules en G2 et en G1.

2.1.3. L'effet oxygène

En l'absence d'oxygène (anoxie), les cellules sont moins sensibles aux radiations : il a été montré que la dose nécessaire pour détruire une cellule doit être 2 à 3 fois plus élevée en hypoxie que dans des conditions normales d'oxygénation.

Ce facteur décrit initialement par Gray est très limitant pour la RT (103); en effet, les tissus ou organes sains sont dans leur quasi-totalité bien oxygénés, donc « sensibles » à l'irradiation. Par contre, les tumeurs, dont la vascularisation est le plus souvent anarchique, présentent des zones hypoxiques nettement plus radio résistantes. Depuis plusieurs décennies, de nombreuses tentatives ont été produites pour surmonter cet obstacle ; certaines (oxygénothérapie hyperbare, radio sensibilisateurs des cellules hypoxiques) ont déçu. D'autres (respiration de carbogène (95% O₂ 5% CO₂), utilisation de la tirapazamine pour lutter contre les hypoxies « aiguës » par occlusion vasculaire intermittente) font encore l'objet d'investigations (104).

De fait, l'une des manières les plus efficaces de lutter contre l'hypoxie pourrait être le fractionnement de l'irradiation: en effet, la destruction progressive, au fil des séances successives, des couches de cellules bien oxygénées, permettrait le rapprochement des cellules hypoxiques des capillaires et donc une « ré oxygénation» de ces cellules, qui retrouvent alors leur radiosensibilité originelle. Cette ré oxygénation peut être étudiée en scintigraphie TEP au ^{18}F -misonidazole et montre que ce phénomène n'est absolument pas général (105).

Une autre solution serait l'utilisation de particules à haut transfert d'énergie linéique, ce type d'irradiation étant beaucoup moins sensible à l'effet oxygène. C'est la raison essentielle qui a fait envisager l'utilisation des neutrons puis des autres particules lourdes chargées (106). Nous développerons ce point ultérieurement.

2.1.4. Autres paramètres influant la réponse à l'irradiation

2.1.4.1. Les facteurs temps

Il convient de considérer deux aspects différents du facteur temps : le fractionnement et l'étalement, même si en pratique ces deux aspects paraissent souvent liés de façon étroite (107).

Fractionnement

C'est la dose délivrée à chaque séance d'irradiation. Le fractionnement consiste à délivrer une faible dose à chaque séance de traitement, ces séances étant espacées de 6 à 24 heures de la suivante. Depuis les travaux de Coutard et de Regaud (1934), il est établi que le fractionnement de la dose totale en séances quotidiennes de 2 Gy (10 Gy/semaine) permet d'obtenir le meilleur compromis pour le rapport efficacité anti tumorale/tolérance des tissus sains (28). En effet le fractionnement de la dose d'irradiation permet aux tissus sains traversés par le faisceau d'irradiation de se réparer ou de se régénérer plus rapidement que la tumeur entre chaque séance d'irradiation (Figure 7). Il permet la réparation moléculaire des radiolésions au niveau de chaque cellule. Il assure donc la survie des tissus à renouvellement lent, caractérisés par des ratio α/β faibles, comme les tissus conjonctifs, les

compartiments de cellules souches, le tissu nerveux et les parenchymes fonctionnels comme le foie, les reins, les poumons (98).

Étalement

L'étalement du traitement est la durée en jours qui s'écoule de la première à la dernière séance du traitement. Cette durée de plusieurs semaines permet la restauration tissulaire par la repopulation cellulaire, ce qui permet la survie des tissus à renouvellement rapide (muqueuses, peau, phanères, moelle hématopoïétique) et permet aux patients de supporter une irradiation à forte dose cumulée. Il faut noter que l'étalement favorise également la survie de la tumeur. Le danger d'un étalement trop important de l'irradiation avait été signalé dès 1922 par Claudius Regaud qui écrivait que le temps optimum d'irradiation des tumeurs devait être de « 15 à 20 jours » (108). Malheureusement, sauf très petit volume, il n'est pas possible de délivrer de fortes doses dans une période si courte (bien que certains essais comme le « CHART » -*Continuous Hyperfractionated Accelerated Radiotherapy*- s'approchèrent beaucoup de cet objectif).

Le choix de l'étalement d'une RT résulte donc d'un compromis : plus bref, le traitement est certes plus efficace sur la tumeur mais expose le patient à des effets secondaires aigus aggravés nécessitant parfois une prise en charge médicale et nutritionnelle lourde ; plus long, la tolérance est bien meilleure mais la probabilité de guérison se réduit considérablement. Ce phénomène reste largement sous-estimé des praticiens : un retard de plus de quelques jours au cours d'une RT expose à une perte considérable d'efficacité anti tumorale, environ -1% de probabilité de guérison par jour supplémentaire d'étalement (109).

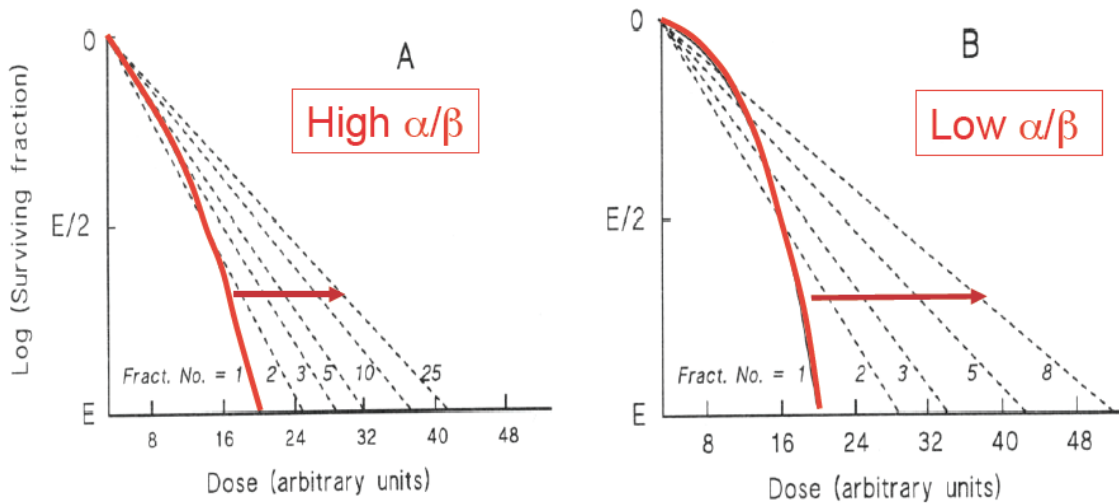


Figure 7 : Effet différentiel du fractionnement selon le ratio α/β , d'après (110).

Manifestation de l'effet différentiel par l'accumulation des fractions

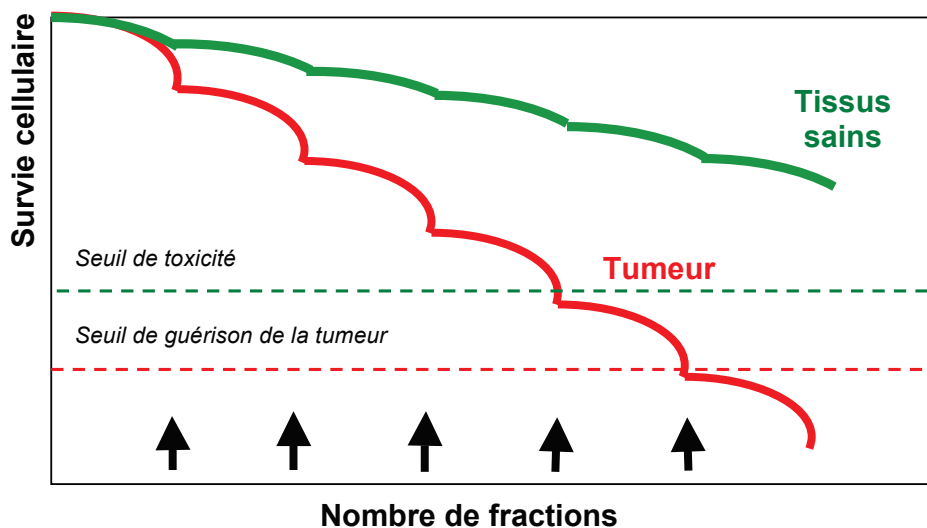


Figure 8 : Modélisation de la survie cellulaire au cours de la progression d'une irradiation fractionnée, avec l'amplification cumulée de l'effet différentiel (modifié, d'après JBalosso)

Grâce à ces mécanismes de réparation moléculaire et de restauration tissulaire – généralement plus performants dans les tissus sains, la répétition des séances d'irradiation conduit, de séance en séance, à une accumulation de ces faibles différences. Au bout d'un traitement de 25, 30, voire plus de fractions de 2 Gy, la différence devient telle que les tissus sains, bien qu'affectés par l'irradiation, auront la capacité de se restaurer suffisamment, tandis que la tumeur aura accumulé suffisamment de lésions cellulaires pour qu'elle finisse par disparaître complètement

(Figure 8). Lorsque la tumeur est plus radio résistante que les organes critiques la situation inverse se produit : une survie de la tumeur au prix de lésions plus ou moins graves des tissus sains, sans bénéfice pour le patient.

Les radiothérapeutes disposent actuellement de modèles radiobiologiques leur permettant de calculer avec une certaine précision les doses biologiquement équivalentes (BED), aussi bien pour les tumeurs que pour les tissus sains, quand la dose par séance est modifiée. Le modèle LQ s'applique le plus souvent sous réserve que les doses par séance soient comprises entre 1 et 10 Gy et en notant que l'étalement n'est pas pris en compte (111).

2.1.4.2. Le transfert d'énergie linéique (TEL)

Ce paramètre n'avait pas grand sens il y a encore quelques années pour la simple raison que la quasi-totalité des irradiations thérapeutiques était réalisée avec des photons et/ou des électrons, particules à « bas » transfert d'énergie linéique, c'est-à-dire entraînant le long de leur parcours dans les tissus une densité faible d'ionisations (avec pour conséquence des lésions - en particulier de l'ADN - assez éloignées les unes des autres et produites par des dépôt d'énergie relativement minimes).

Dans les années 1970-80, un espoir était né avec les neutrons, particules à transfert d'énergie linéique plus élevé (donc avec une densité d'ionisations et des lésions plus importantes), dont on attendait une meilleure efficacité biologique (moindre résistance des tumeurs radio résistantes) et une moindre sensibilité à l'effet oxygène (moindre résistance des tumeurs hypoxiques).

L'utilisation des neutrons a malheureusement déçu, du fait des piètres performances balistiques de ces faisceaux caractérisés, comme les rayons X, par un rendement en profondeur exponentiel décroissant conduisant à une irradiation d'un volume considérable de tissus sains en condition de haut TEL d'où l'observation de graves séquelles tardives (fibrose en particulier) (112).

En revanche, l'intérêt pour les particules à « haut » TEL est actuellement relancé avec les ions carbone qui n'ont pas ces inconvénients balistiques mais ont les

mêmes avantages radiobiologiques et dont nous reparlerons dans la partie dédiée de la thèse.

2.1.4.3. Autres comorbidités associées à une radiosensibilité accrue

Certaines affections acquises comme l'infection à VIH (113), le diabète (114), l'obésité (effet bolus) ou certaines maladies inflammatoires systémiques (115) peuvent conférer une sensibilité aux radiations ionisantes légèrement accrue du fait respectivement d'une immunodéficience, d'une micro angiopathie ou du développement d'auto anticorps dirigés contre les protéines de réparation de l'ADN (116). La sclérodémie systémique et les maladies fibrosantes en général, comme la fibrose retro péritonéale idiopathique, sont en revanche des situations cliniques à très haut risque avec des cas de complications létales post RT décrits de manière itérative dans la littérature (117, 118).

Un grand nombre de paramètres, dont certains sont contrôlables, sont ainsi susceptibles d'influencer la tolérance à la RT. Si l'on souhaite s'intéresser aux déterminants intrinsèques de la réponse des tissus sains aux radiations ionisantes et aux moyens de prévenir et traiter les toxicités les plus sévères, il est nécessaire d'envisager un approfondissement des connaissances des mécanismes d'action des radiations ionisantes et de la réponse intégrée de l'organisme. Le chapitre suivant en décrit l'état de l'art.

3. Mécanismes d'action des radiations ionisantes

3.1. Principes généraux

L'eau qui est le principal constituant de la matière vivante est une molécule particulièrement radiosensible. En effet, les radiations ionisantes – par définition - possèdent une énergie cinétique supérieure à l'énergie de liaison des atomes constitutifs de la molécule d'eau. Ce transfert d'énergie est suivi d'une cascade de réactions physico-chimiques puis biologiques à l'échelon moléculaire, subcellulaire, cellulaire, tissulaire et enfin au niveau de l'organisme entier.

3.1.1. Evènements physiques radio induits

Durant la phase physique (10^{-18} à 10^{-13} s), les radiations agissent sur les atomes rencontrés en excitant (excitations) ou en éjectant des électrons de leurs nuages électroniques (ionisations). La désorganisation de ces nuages électroniques correspond à des micro dépôts d'énergie aléatoirement répartis le long du parcours de la particule incidente. En effet, le passage d'une particule ionisante dans le milieu biologique produit une arborescence de dépôts d'énergie élémentaires (ionisations) aléatoirement espacés et de valeurs très différentes. Pour les particules de haute énergie qui sont utilisées pour la totalité des RT les événements significatifs pour la létalité cellulaire sont les grappes d'ionisations de fin de parcours des électrons mis en mouvement (électrons secondaires) capables de produire localement une très forte densité d'énergie déposée. Ce mécanisme correspond à environ 90% des effets des radiations de haute énergie. La contribution restante, environ 10%, pourrait en tout ou partie être due à des interactions avec la couche électronique la plus profonde des atomes cibles, la couche K, entraînant des cascades d'électrons Auger. Ces événements sont dénommés événements de cœur ou événements K (119).

3.1.2. Evènements chimiques radio induits

La phase chimique dure de 10^{-13} à quelques secondes. Les ions formés lors de la phase physique interagissent principalement avec l'eau (radiolyse de l'eau), principal constituant de la matière vivante. Ces interactions conduisent par diverses réactions à des ruptures de la molécule d'eau produisant des radicaux libres, surtout oxydants, comme les groupes OH^\bullet et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), responsables de l'attaque chimique des macromolécules cellulaires et en particulier de l'ADN causant un grand nombre de lésions moléculaires de l'ADN. Des dizaines de variétés de modifications chimiques ont été identifiées (120, 121). La nature des lésions de l'ADN dépend de la densité d'énergie des micro dépôts radio induits: par exemple on chiffre à 1-10 eV par nm^3 l'énergie nécessaire pour créer une modification de base (DB), 10-100 eV par nm^3 pour une cassure simple-brin (CSB), plus de 100 eV par nm^3 pour une cassure double-brin (CDB). Sachant qu'il faut respectivement 1-10 min, 10-20 min et 50-60 min pour réparer 50% des ces lésions, la densité d'un micro dépôt d'énergie détermine également la réparabilité de la lésion qu'il crée dans l'ADN : plus l'énergie nécessaire pour créer un dommage de l'ADN est élevée, plus il faudra de temps pour le réparer. Cette conclusion explique notamment pourquoi une irradiation avec des ions lourds produisant plus de micro dépôts d'énergie élevée induit plus de létalité cellulaire que des rayons gamma. Ainsi, la présence de dommages multiples concentrés dans un petit volume constitue un risque élevé de létalité cellulaire. Toutefois, la probabilité d'incidence de tels dommages est relative. En effet, la pluie aléatoire de micro dépôts d'énergie qui suit une irradiation obéit à des lois statistiques précises (Poisson et Gauss). Par exemple, une CDB ne peut être le résultat de deux traces de particules superposées produisant chacune 1 CSB. Par contre, la réponse biologique quelques minutes après l'irradiation peut notamment transformer 1 DB en CSB lors du processus d'excision-resynthèse. De même, des CSB produites en grand nombre par les mécanismes de recombinaison peuvent aboutir à la formation de CDB.

3.1.3. Evénements biochimiques et biologiques radio induits

La phase biochimique commence quelques secondes après l'irradiation et s'étend sur plusieurs heures : elle est la conséquence des effets physiques et chimiques sur les molécules du vivant dont l'ADN. En effet, les dégâts causés par les radiations ionisantes dans le noyau cellulaire sont 100 à 1000 fois plus efficaces pour provoquer la mort cellulaire que les dégâts créés dans les membranes ou dans le cytoplasme (122). Les mécanismes de réparation de la cellule entrent en action pour restaurer l'ADN endommagé. La viabilité de la cellule, du tissu ou de l'organisme irradiés dépend de la rapidité et de la fidélité de cette réparation.

La phase biologique représente toutes les conséquences de la phase biochimique au niveau de la cellule et de l'organisme et peut s'étendre sur des années. En particulier, la réparation et la signalisation des dommages de l'ADN entrent en action pour restaurer l'ADN endommagé. La viabilité de la cellule, du tissu ou de l'organisme irradiés dépend de la rapidité et de la fidélité de cette réparation.

Les enzymes et facteurs de transcription qui l'orchestrent ont pu être caractérisés dès la fin des années 80. Les maladies de la réparation, dont nous reparlerons dans un paragraphe suivant, furent d'excellentes sources d'hypothèses qui ont amené à construire les modèles de réparation (123) et des voies de signalisation.

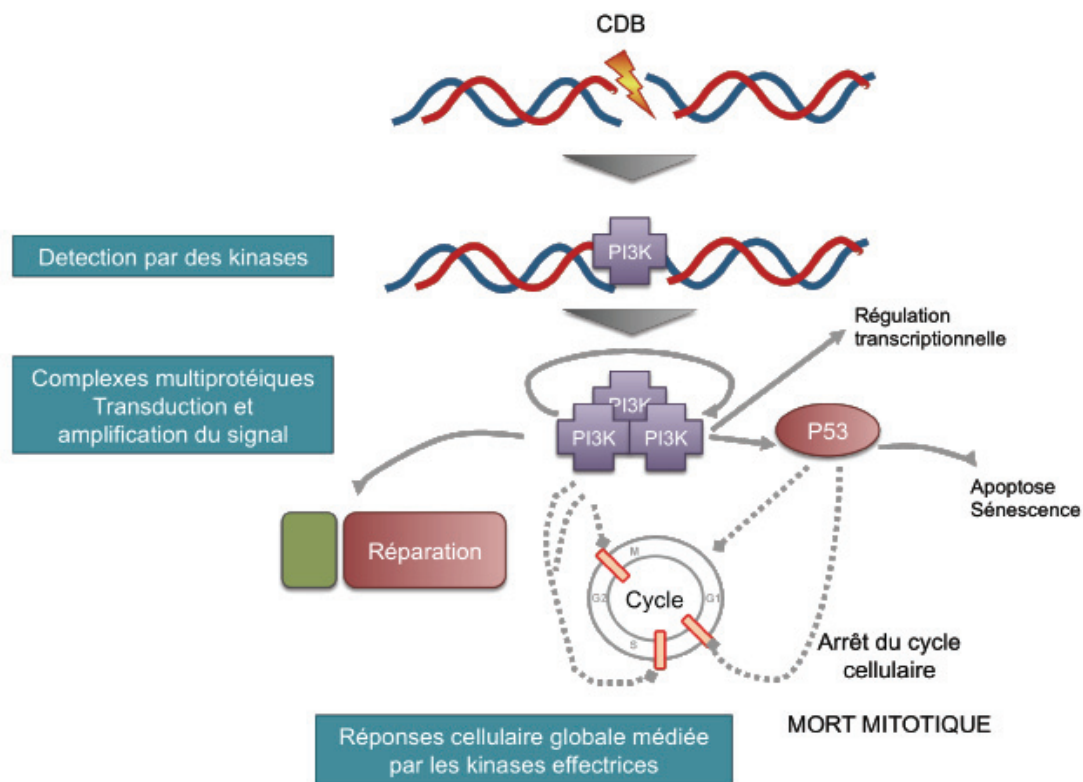


Figure 9: Voie de signalisation de la réponse cellulaire aux dommages radio induits de l'ADN

L'induction des dommages de l'ADN est suivie par une série d'évènements coordonnés au sein de complexes multi protéiques (124) (Figure 9). Il peut en résulter une grande variété de conséquences comme l'expression de nombreux gènes et leurs produits protéiques, l'exposition membranaire de récepteurs de facteurs de croissance, la régulation de la mort cellulaire.

L'irradiation a la capacité de perturber profondément le déroulement du cycle cellulaire tant en phase G1, notamment par l'induction de la protéine p53, qu'en phase G2. Par exemple, la protéine p53 fait partie des voies de contrôle du cycle cellulaire. Elle est phosphorylée par certaines kinases activées par les radiations ionisantes comme la protéine ATM. De concert avec d'autres protéines comme GADD45 et p21, la phosphorylation de p53 bouleverse les complexes cycline-Cdk en provoquant un arrêt ou un ralentissement du passage G1/S. Les radiations ionisantes provoquent également un arrêt en G2 et l'accumulation des cellules en phase G2-M dont l'ampleur est généralement proportionnelle à la dose.

Finalement, la cellule irradiée, selon sa radiosensibilité intrinsèque et la dose reçue, pourra soit survivre, ce qui signifie avoir une capacité de division et une descendance normale ; soit conserver des mutations, responsables éventuellement d'une instabilité génomique, ou des dommages non réparés causes de la mort cellulaire à plus ou moins long terme. La mort radio induite est le résultat final de diverses contributions pouvant prendre des aspects très différents et pouvant coexister : la mort mitotique, la sénescence et l'apoptose. L'importance relative de chaque modalité dans le phénomène global de mort radio induite peut varier drastiquement suivant la nature du tissu, son statut génétique mais beaucoup moins en fonction du type d'irradiation.

3.1.4. Inflammation et réactions tissulaires

Bien que l'on ait une connaissance approfondie de l'ensemble des phénomènes biochimiques et moléculaires, à des doses modérées leur perception clinique est quasi nulle. Seule une ampleur suffisante des phénomènes pour qu'ils puissent induire des réactions tissulaires conséquentes est source de manifestations organiques et donc de symptômes. Ces manifestations obéissent alors à d'autres mécanismes qui sont ceux des régulations organiques, des mécanismes de défense de l'organisme, de l'homéostasie tissulaire, etc.

Les mécanismes très généraux de l'inflammation jouent un rôle important dans ces manifestations. En effet il se produit lors des premières étapes une surproduction de cytokines pro inflammatoires (TNF α , IL1, IL6) (125) Des chimiokines sont ensuite relarguées, attirant les cellules inflammatoires dans le volume irradié à forte dose. Contrairement à ce qui est observé physiologiquement, il se produit une fibrogénèse chronique liée à une surproduction de TGF β par les fibroblastes et les cellules endothéliales recrutées (126). Il se produit une transition épithélo-mésenchymateuse et un afflux de cellules souches mésenchymateuses qui entretient cette cascade. Il est décrit une perturbation de la gestion du stress oxydatif dans le volume irradié (127). Il est intéressant de noter que les voies de signalisation de la réparation et celles de la fibrogenèse sont interconnectées (128) (Figure 10).

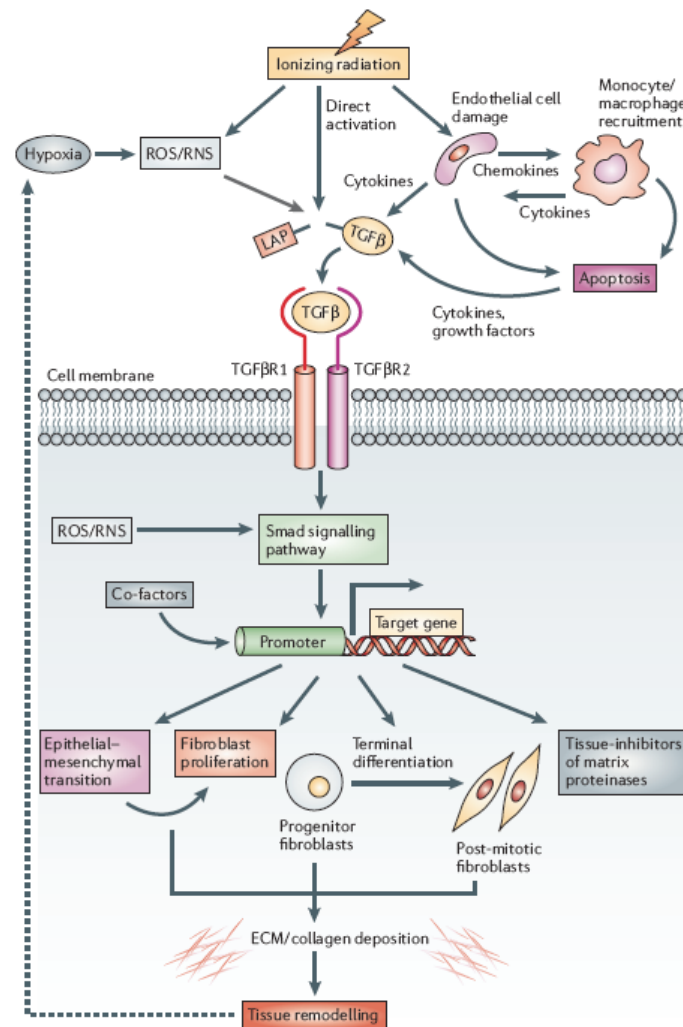


Figure 10: Voie de la fibrogenèse dépendant de TGFβ, d'après (23)

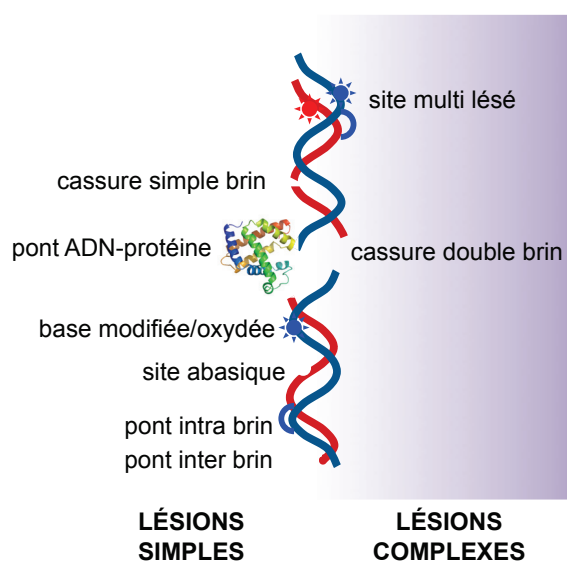
Mais ces phénomènes eux-mêmes échappent largement à l'appréciation clinique qui finalement se fonde sur des notions phénoménologiques plus simples comme la chronologie des phénomènes. Néanmoins, derrière cette chronologie existe des mécanismes assez spécifiques.

3.2. Spectre des lésions radio induites

Au niveau moléculaire, les radiations ionisantes engendrent diverses lésions touchant l'ensemble des compartiments cellulaires avec une efficacité inégale. Les dommages causés par les RI dans le noyau cellulaire étant 100 à 1000 fois plus toxiques que ceux créés dans les membranes ou dans le cytoplasme, les

radiobiologistes ont surtout étudié les lésions de l'ADN. Les RI se distinguent de tous les autres agents génotoxiques par la diversité des lésions qu'elles créent dans l'ADN (122, 129-131) (Figure 11). Supportant l'information génétique, l'ADN est également la matrice pour sa propre réplication et pour la transcription. Son endommagement peut conduire à des dysfonctionnements pouvant aboutir à la mort cellulaire, à l'induction de mutations et d'aberrations chromosomiques, à une transformation cellulaire et à la cancérogenèse. Une variété de lésions élémentaires de l'ADN peut être induite en réponse à une irradiation. Ces lésions divergent par leur complexité, les voies de signalisation et de réparation les prenant en charge et leur réparabilité.

Une dose de 1 Gy crée au sein de l'ADN d'une cellule : 40 lésions « double brin » (ruptures des deux chaînes de l'ADN), de 500 à 1000 lésions « simple brin » (ruptures d'une seule chaîne), de 1 000 à 2 000 lésions de base et environ 200 pontages (ADN-ADN ou ADN-protéine). La sévérité des lésions de l'ADN dépend surtout de la densité d'énergie des micro dépôts radio induits qui les ont créés, notamment à travers la quantité de peroxydation de l'ADN produite : 1 à 10 eV/nm³ sont nécessaires pour créer une modification de base, 10 à 100 eV/nm³ pour une cassure simple-brin, plus de 100 eV/nm³ pour une cassure double-brin. Sachant qu'il faut respectivement 1 à 10 min, 10 à 20 min et 50 à 60 min pour réparer 50% de ces lésions, la densité d'un micro dépôt d'énergie détermine également le temps de réparation nécessaire. Les modifications de bases sont essentiellement réparées par excision-resynthèse, processus qui est généralement rapide.



On considère qu'une CDB est le résultat de deux CSB opposées espacées de moins de 50 paires de bases. Toutefois, il faut rappeler qu'une CDB ne peut résulter de deux CSB qui seraient produites par la superposition de deux traces (probabilité négligeable pour des doses biologiques) ou par la

Figure 11: Spectre des lésions radio induites de l'ADN

production indirecte radicalaire (l'effet du *swing-over* n'a jamais été démontré en conditions physiologiques) mais résulte bien d'une peroxydation instantanée des deux brins. Par contre, lors de la réparation d'un dommage de base ou de CSB, les systèmes biologiques (de réparation) peuvent produire une CSB sur le brin opposé, ce qui conduirait alors à une CDB. Toutefois, l'incidence de ces CDB secondaires est temporellement différente de la production physique des CDB produites par les radiations. Les CDB sont des lésions très délétères même si une large proportion de ces dommages peut être réparée par la cellule suite à l'irradiation. Ainsi une minorité des micro dépôts d'énergie (1-2%), ceux égaux ou supérieurs à 100 eV/nm³, joue un rôle significatif dans la létalité radio induite. En cas de non réparation, les CDB sont souvent létales pour la cellule. Le nombre de CDB non réparées peut être corrélé avec la radiosensibilité cellulaire (132).

La littérature des années 1990-2000 a souvent évoqué des modèles de dommages de l'ADN dits complexes appelés *Locally Multiple Damage Sites* (LMDS) pour illustrer la possibilité de l'existence d'amas locaux de dommages de bases, CSB et CDB sur l'ADN (133). L'intérêt pour ce modèle a même occulté le fait qu'un dommage individuel peut suffire à induire transformation ou mort cellulaire. Ainsi, en plus de certains artefacts techniques, quelques auteurs ont pu sur interpréter leurs résultats et confondre les dommages dus aux radiations seules et ceux issus de la réparation alors qu'un simple calcul montre que la concentration de 2 dommages différents sur quelques bases ne peut être produite que par des doses supérieures au MGy. A ce jour, aucune preuve expérimentale rigoureuse de l'existence de LMDS induits seulement par les radiations n'a été apportée.

3.3. Les cassures double-brin de l'ADN, déterminants majeurs de la létalité cellulaire radio induite

Les CDB sont activement réparées par la cellule bien que cette réparation soit rarement parfaite du fait de l'atteinte simultanée des deux brins complémentaires (134-136). Certaines CDB sont cependant irréparables ou non réparées. **Le taux de CDB résiduelles non réparées apparaît comme le facteur le mieux corrélé à la radiosensibilité cellulaire (132).**

Au moment de la mitose, les chromosomes sont attachés au faisceau mitotique par leurs centromères. Dans le cas d'un fragment acentrique consécutif à une CDB non réparée, un phénomène de rejet du fragment hors du noyau (exonucléose) puis de la cellule (exocytose) peut se produire conduisant à la formation de micronoyaux et à des aberrations chromosomiques (translocations, chromosomes en anneaux, inversions et chromosomes dicentriques / acentriques) dans la cellule survivante. Cette cellule et ses descendantes finissent le plus souvent par mourir au fil des mitoses successives (137-139). La production de micronoyaux est ainsi le révélateur principal de la mort mitotique, considérée comme le type de mort radio induite le plus fréquent. Le nombre de micronoyaux augmente proportionnellement avec la dose, et est étroitement corrélé à l'effet létal des radiations ionisantes.

Finalement il existe une relation quantitative simple entre les trois événements suivants : CDB non réparées de l'ADN, nombre d'aberrations chromosomiques et mort cellulaire radio induite. En particulier, pour induire la mort d'un fibroblaste humain $1,2 \pm 0,6$ cassures chromosomiques ou $3,5 \pm 1,5$ CDB non réparées par cellule sont suffisantes (140).

D'autres formes de morts radio induites liées aux CDB non réparées ont été décrites et exploitées dans des tentatives de tests diagnostiques de radiosensibilité dont nous reparlerons dans la discussion. L'apoptose est une mort dite "programmée", généralement dépendante de p53, qui peut être déclenchée par seulement une CDBs non réparée. Elle aboutit à une libération d'endonucléases qui digèrent massivement l'ADN. Contrairement à la mort mitotique, l'apoptose se produit le plus souvent en interphase (G1, G2). On confond encore souvent les micronoyaux, entités propres, douées d'une capacité à suivre les différentes phases du cycle cellulaire tant qu'ils sont au sein de la cellule, et les corps apoptotiques, fragments d'ADN sans membranes. Plus récemment encore, l'arrêt irréversible en G1 ou sénescence a été décrit, lui aussi comme une forme de « mort radiobiologique » ; il est également associé à une CDB non réparée et il dépend surtout de p21. Il est prédominant chez les fibroblastes normaux (en moyenne, 67% des cellules sont définitivement en arrêt après une dose de 4 Gy) mais il est compatible avec une existence métabolique prolongée de la cellule (on l'a même comparé à une forme de vieillissement, la sénescence).

Ce paragraphe nous montre ici qu'empiriquement, les CDB non réparées pourraient expliquer à elles seules la mort radio induite, et ce, en dépit de leur faible taux d'incidence (seulement 40 CDB produites par Gy par cellule humaine). C'est ce paradoxe qui a fait hésiter longtemps les radiobiologistes sur le rôle prépondérant des CDB car il paraissait plus logique que les dommages de bases ou les CSB, plus nombreux, entraînent des effets biologiques importants. Afin de mieux illustrer l'importance des CDB, résumons dans le chapitre qui vient l'état actuel des connaissances sur la signalisation et la réparation des CDB.

3.4. Signalisation et réparation des CDB

Ce chapitre fait état de la littérature sur la signalisation et la réparation des CDB : les critiques et les insuffisances des modèles qui cohabitent actuellement ont amené le laboratoire d'accueil de la thèse à faire une proposition d'ensemble plus fidèle à la perception actuelle des données biologiques et cliniques.

3.4.1. Signalisation des CDB

Les CDB de l'ADN sont le résultat d'un stress oxydatif massif concentré localement. L'oxydation du milieu environnant peut provoquer également des changements biochimiques au niveau de certaines protéines qui présenteront alors des fonctions modifiées. En particulier, le pouvoir phosphorylant de certaines kinases peut augmenter après l'irradiation et déclencher une cascade d'événements moléculaires temporellement et hiérarchiquement ordonnés. C'est le cas notamment de la protéine kinase ATM qui peut être considérée comme l'un des acteurs majeurs de la réponse aux radiations mais aussi comme la protéine-clé dans la signalisation et la réparation des CDB. D'ailleurs, la mutation d'ATM conduit au syndrome de l'ataxie télangiectasie (AT), syndrome associé à la plus forte radiosensibilité connue chez l'homme. Les récentes analyses en protéomique ont permis d'identifier plus de 900 sites de phosphorylation médiée par ATM, englobant plus de 700 protéines cibles

(141). Enfin, l'un des arguments forts pour considérer les CDB comme les événements-clés de la létalité cellulaire est que la très grande majorité des syndromes génétiques associés à une radiosensibilité significative sont causés, tout comme l'AT, par la mutation de protéines impliquées directement ou indirectement dans la réparation et la signalisation des CDB (Tableau 10).

Pour résumer les paradigmes actuels, il faut insister sur le fait que tous les modèles proposés jusqu'à ce jour sont basés sur des événements qui se passent dans le noyau des cellules.

Ainsi, l'un des premiers événements post irradiation est la phosphorylation du variant X de l'histone H2A par la kinase ATM au niveau du site de la lésion de l'ADN. La mise en évidence de cet événement majeur est à l'origine de la détection des CDB par immunofluorescence car la phosphorylation des histones H2AX (gH2AX) produit des foci nucléaires visibles au microscope dont le nombre est proportionnel, sinon exactement égal au nombre de CDB. Comme on le verra plus tard, la phosphorylation gH2AX est le reflet de la reconnaissance des CDB par un mode de réparation spécifique : la suture non homologue. Toutefois, l'engouement des auteurs pour la technique d'immunofluorescence et la détection de protéines formant des foci nucléaires après un stress génotoxique, fait qu'une somme considérable de données a été produite.

La plupart des substrats d'ATM furent ainsi détectés. En particulier :

- le complexe protéique MRE11-RAD50-NBS1 (MRN), où MRE11 possède une activité endo- et exonucléase requise pour la résection de l'ADN et où les 2 autres acteurs protéiques sont requis pour une activité maximale.
- les médiateurs protéiques, tels que MDC1 et 53BP1, probablement impliqués dans la reconnaissance des lésions
- BRCA1, protéine stabilisatrice de fonctions kinases
- P53, Chk1 et Chk2 respectivement impliquées dans les arrêts du cycle en G1 et G2.

Malheureusement, la co-immunofluorescence de deux voire trois protéines fut préférée à une l'immunofluorescence appliquée par un seul anticorps à la fois: la conséquence pratique fut que l'on suggéra la superposition (co-localisation) d'une multitude de substrats au mépris d'une quantification rigoureuse des foci et sans considérer les temps post irradiation étudiés. En parallèle, le laboratoire d'accueil montrait que la co-immunofluorescence était la source d'artéfacts d'optiques où les spectres d'émission et d'excitation des fluorophores fluorescéine et rhodamine ne sont pas totalement disjoints sur l'échelle des longueurs d'onde : par exemple, un anticorps marqué en rouge peut donner un signal en vert. L'exemple le plus représentatif est la co-localisation gH2AX-MRE11. Il apparaît en immunofluorescence simple que les foci gH2AX apparaissent dès les premières minutes post irradiation et leur nombre diminue progressivement jusqu'à 24 h. A l'inverse, les foci MRE11 n'apparaissent que vers les premières heures post irradiation et ils sont systématiquement moins nombreux que les foci gH2AX. En utilisant la co-immunofluorescence, tous les foci gH2AX et MRE11 apparaissent systématiquement co-localisés quel que soit le temps de réparation. Cette dernière observation, bien que biaisée, est à l'origine du modèle où le complexe MRN précède puis colocalise avec les formes phosphorylées d'H2AX (142). Cet exemple montre comment, à partir d'artéfacts techniques certains modèles de réparation et de signalisation ont pu être proposés et publiés. **Une reconsidération générale des co localisations dynamiques des acteurs protéiques de la réparation est donc à effectuer.**

3.4.2. Principales voies de réparation de l'ADN (Figure 12)

3.4.2.1. La recombinaison homologue

La recombinaison homologue est une des premières voies de réparation des CDB qui ait été découverte. Son existence a été établie à partir de micro-organismes (bactéries, levures) qui sont continuellement en prolifération, en mitose ou en méiose. Chez de tels organismes, la taille du génome est très réduite et la probabilité de récupérer la bonne séquence manquante sur le chromosome homologue n'est pas négligeable. C'est pourquoi ce mode de réparation a été

appelé : recombinaison homologue. Elle est subdivisée en trois étapes : la phase pré synaptique, la phase synaptique et la phase post synaptique. Elle est toujours initiée par la génération d'ADN simple-brin, et promue par diverses protéines dont le complexe MRN conjointement avec des protéines axillaires : CtIP, les hélicases de la famille Recq, et les nucléases EXO1 et DNA2. Les brins d'ADN simple-brin résultant sont ensuite « enrobés » par le complexe RPA avant d'être substitués par les protéines RAD51 avec l'aide de ses paralogues RAD52 et les protéines FANCD1/BRCA2. A travers les jonctions de Holliday, le nucléo filament RAD51 formé par sa phosphorylation en tyrosine et sa stabilisation assurée par l'heptamère RAD52 permet un échange de brin et une repolymérisation. La résolution de la lésion est finalement obtenue de manière fidèle via les ADN polymérases, la ligase I, l'hélicase et les résolvas. La recombinaison homologue reconstitue fidèlement l'information génétique par échange entre les 2 chromatides-sœurs homologues (143). Elle ne peut donc s'effectuer qu'en phase S ou G2/M du cycle cellulaire. Il est important de noter que les dernières étapes de la recombinaison homologue ne sont toujours pas clairement élucidées pour les cellules humaines. De plus, aucun syndrome génétique humain associé à la radiosensibilité n'est causé par la mutation de protéines impliquées directement dans la recombinaison homologue comme RAD51 et RAD52, suggérant l'importance vitale de ce mécanisme biologique mais aussi illustrant le fait que ce mode n'est pas majoritaire dans la réponse tissulaire aux radiations.

3.4.2.2. La suture non homologue (Non Homologous End Joining)

Dans les années 1980, l'observation de la réponse aux radiations de cellules de mammifères quiescentes aboutit à la découverte d'un mode de réparation des CDB alternatif à la recombinaison homologue. A l'inverse de celui-ci, la réparation par suture consiste à ressouder les brins coupés. Comme ce mode est essentiellement actif en G0/G1, la notion d'homologie de brins est inexistante. Pourtant, le terme de recombinaison *homologue* fut si populaire que par opposition on attribua le terme non homologue à la suture pour donner *Non Homologous End Joining (NHEJ)*. Généralement fautive, elle permet de façonner puis remettre les 2 brins bout à bout sans échange mais avec perte d'information (144). Des données contradictoires de la littérature montrent que les mécanismes exacts de la suture non homologues ne

sont pas encore complètement définis. Néanmoins, dans le cadre des modèles actuels, les CDB sont reconnues par la protéine Ku qui se lie à la protéine kinase DNA-PKcs pour former la kinase DNA-PK, une sérine-thréonine kinase, comme ATM. La suture proprement dite est assurée par le complexe XLF-XRCC4-ligase IV. Dans certains cas, l'exo-endonucléase Artémis est recrutée pour permettre la dégradation des extrémités de l'ADN afin de les rendre compatibles avec la ligation. Toutefois, cette activité est responsable de l'absence de fidélité du NHEJ puisqu'elle provoque la perte de plusieurs bases d'ADN. Plusieurs variantes du NHEJ ont été proposés sans jamais s'imposer par l'expérience ou la réalité clinique (145-147). A l'inverse de la recombinaison homologue, de nombreux syndromes génétiques associés à une forte radiosensibilité sont causés par la mutation de protéines impliquées dans le NHEJ. C'est notamment le cas de la mutation de la ligase IV qui, avec AT représente les syndromes les plus hyper radiosensibles. Il faut cependant ajouter que, à l'exception de certaines lignées tumorales, les mutations homozygotes des protéines KU et DNA-PKcs n'existent pas chez l'homme, suggérant ainsi leur importance cruciale pour la survie cellulaire.

Depuis une dizaine d'années la dualité, recombinaison homologue / suture non homologue, constitue le paradigme de la réparation et de la signalisation des CDB. Pourtant, cette théorie a été basée sur des données qui peuvent être biaisées comme pour la co-immunofluorescence et sur le fait que la réalité clinique n'est pas bien transcrite : les syndromes humains liés aux défauts de recombinaison homologue n'existent pas et les mutations causées sur les protéines de suture n'expliquent pas la radiosensibilité tissulaire significative mais modérée observée après RT chez certains patients. Il semble qu'il y ait donc aujourd'hui un fossé entre l'intérêt des moléculaires pour édifier des modèles mécanistiques sophistiqués qui ne sont pas le reflet de ce qui est observé en clinique, et à l'inverse, une attente des cliniciens pour une prédiction efficace et une prévention des toxicités.

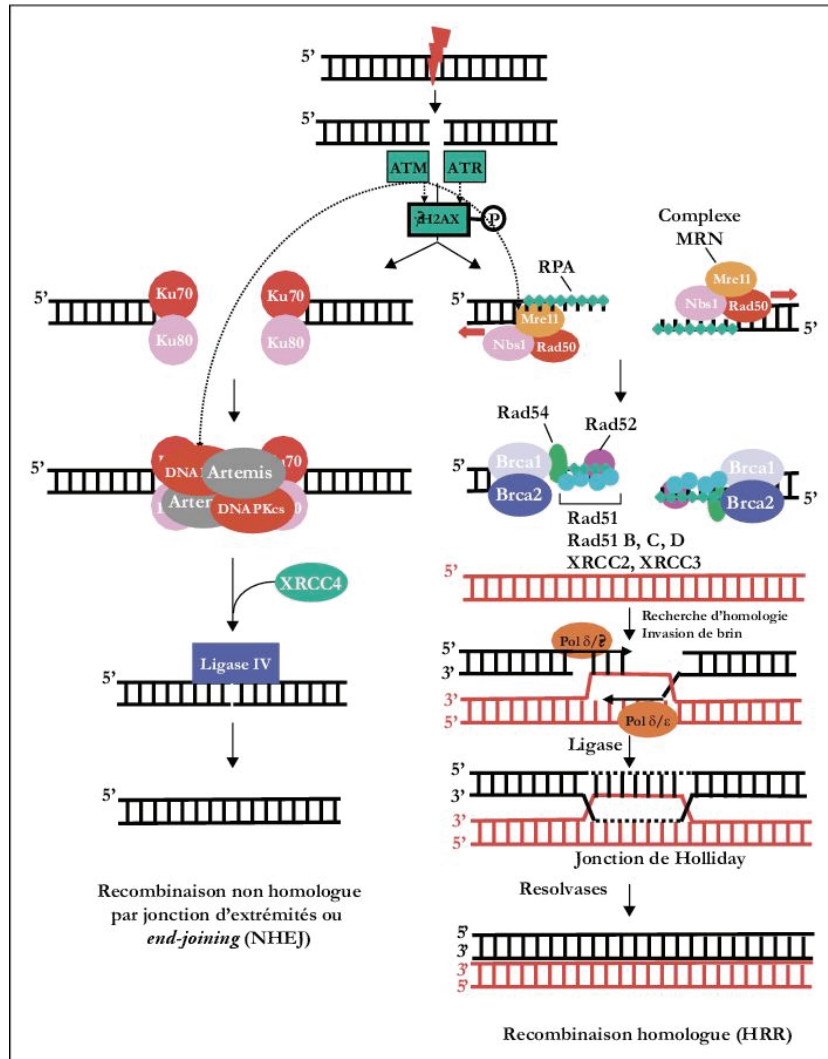


Figure 12: Voies communes de réparation des CDB d'après (148)

3.4.3. ATM, protéine centrale de la réponse cellulaire aux dommages radio induits de l'ADN

Identifiée dès 1926, l'ataxie télangiectasie se manifeste par une ataxie cérébelleuse de pronostic sévère et précoce, des télangiectasies oculo-cutanées, une immunodéficience majeure, des remaniements chromosomiques spontanés et une prédisposition à de nombreux cancers (essentiellement leucémies et lymphomes). Une hypersensibilité aux radiations ionisantes est constante. L'incidence d'AT est estimée à 10^{-5} . Les porteurs hétérozygotes, qui constituent environ 1% de l'ensemble de la population, présentent un risque accru de cancer de même qu'une certaine radiosensibilité (149).

C'est en 1975 que la radiosensibilité des lignées cellulaires des patients atteints d'ataxie télangiectasie a été mise en évidence, avec pour conséquence des aberrations chromosomiques (150). Le lien entre cette hyper radiosensibilité et un déficit de réparation des CDB a été mis en évidence en 1997 (151). Il s'agit à ce jour de la réparatose associée à la plus forte radiosensibilité en pathologie humaine. **La protéine correspondante doit donc être centrale dans la voie de la réponse cellulaire aux dommages radio induits de l'ADN et très conservée.**

Vingt ans plus tard, le gène de cette maladie, appelé *ataxia telangiectasia mutated* (ATM) a été localisé sur le chromosome 11q23 et identifié comme une protéine kinase (350 kDa) composée de 3056 acides aminés (152). Cette protéine-clé est hautement conservée (153).

3.4.3.1. Structure d'ATM

Cette sérine/thréonine protéine kinase est dotée d'un domaine catalytique C-terminal de type phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) activant de multiples substrats.(Figure 13) Ce domaine présente une homologie marquée avec le site catalytique de cinq autres kinases impliquées dans la surveillance du génome (ATR, ATX/SMG-1, DNA-PKcs) ou de grandes voies métaboliques (FRAP^{mTOR}, TRRAP). Les domaines FATC et PRD régulent l'activité kinase. Le domaine FAT interagit avec le domaine kinase lui même pour stabiliser la région C-terminale au moment de l'activation de la protéine (154). Au niveau N-terminal, ATM partage avec la huntingtine une région de répétitions en tandem HEAT, directement liée à la partie C-terminale de NBS1 afin de phosphoryler H2AX sur son résidu sérine 139 (155). Cette région est également impliquée dans la voie d'importation nucléaire classique (156). Nous y retrouvons enfin deux domaines NLS pour le transport nucléaire.

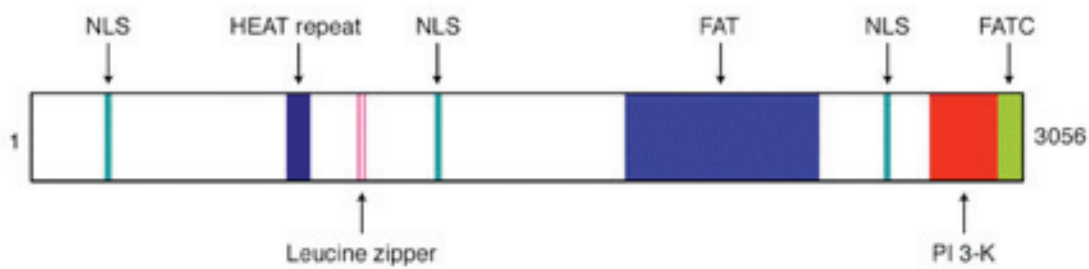


Figure 13 : Structure de la protéine ATM

ATM, DNA-PKcs et ATR, les autres membres de la superfamille *phosphoinositide-3-kinase-related protein kinase* (PIKK), sont recrutées sur les sites d'ADN endommagés par des protéines partageant des domaines communs et extrêmement conservés, respectivement NBS1, Ku80 et ATRIP (157).

3.4.3.2. Distribution d'ATM, tissu spécificité et corrélations avec la radiosensibilité

La distribution cellulaire d'ATM apparaît ubiquitaire, mais elle est volontiers davantage dosée au niveau splénique, thymique, gonadique et des neurones cérébelleux de Purkinje. A noter que les cellules où ATM est peu concentré sont les plus radiosensibles (158).

Son réservoir de base, en l'absence d'activation, est nucléaire dans les fibroblastes, les lymphocytes et les cellules gonadiques; en revanche, nous la retrouvons plutôt au niveau cytoplasmique dans les cellules de Purkinje et les endothélocytes (159-161). Les variations d'expression et de compartimentation de la protéine apparaissent liées aux fonctions tissu-spécifiques d'ATM dans les phénomènes de recombinaison physiologiques (brassage méiotique dans les cellules germinales, constitution des répertoires VDJ dans les tissus immunitaires). Au niveau cérébelleux, la fonction spécifique d'ATM reste peu connue mais nous savons l'importance de la neurodégénéscence de ce type cellulaire dans le phénotype de la maladie (ataxie). La translocation se produit au cours de l'embryogénèse des cellules neuronales afin d'orchestrer une réponse intégrée au stress oxydatif auquel ce type cellulaire est particulièrement exposé (162). Les cellules de Purkinje de patients souffrant d'AT homozygote présentent une dégénéscence liée à une désactivation de la voie AKT et de l'autophagie, expliquant l'ataxie (163, 164). Notons enfin de

Artemis, la voie de réparation des CDB par la suture ; via H2AX, l'amplification du signal de réparation ; via BRCA1 et le complexe BASC, la réparation par recombinaison homologue ; et via p53, Chk2 et p95/NBS1, l'arrêt de la progression du cycle cellulaire en phase G1, S et G2 (168, 171, 172). L'analyse des cinétiques de réparation a montré qu'ATM était nécessaire à la réparation d'un sous-groupe de CDB (environ 10 %) qui sont habituellement réparées avec une cinétique lente, alors que la plupart des CDB sont réparées très rapidement (173). Il semble exister un seuil de dose (≥ 100 mGy) pour activer la kinase. Plus de 700 substrats ont en réalité été identifiés, certains étant impliqués dans des voies cytosoliques indépendantes de la réponse cellulaire aux dommages radio induits de l'ADN comme la transduction du signal, la structure et la mobilité cellulaire ou le trafic protéique intracellulaire (141). Nous y reviendrons ultérieurement. Dans le contexte de la réponse cellulaire aux dommages radio induits de l'ADN des monomère actifs de pATM peuvent également être exportés dans le cytosol selon une modalité NEMO-dépendante afin d'activer la kinase IKK puis la voie NF- κ B (174, 175).

ATM a longtemps été considérée comme une protéine exclusivement nucléaire. Toutefois, chez les patients souffrant d'AT, certains traits sont liés à des fonctions cytoplasmiques : le niveau élevé de facteurs de croissance (176), l'insulino-résistance (177), la modification du cytosquelette (178), le déficit de l'immunité humorale (179), les modifications de la régulation des canaux K^+ (180). Il vient également d'être démontré que les télangiectasies en particulier oculaires présentées par les patients sont liées à une néoangiogenèse pathologique en réponse à un stress oxydatif excessif (181). Nous exploiterons ces données par la suite.

La caractérisation moléculaire des syndromes congénitaux associés à une radiosensibilité accrue a permis d'incriminer un défaut de fonctionnalité des protéines de la réponse cellulaire aux dommages radio induits de l'ADN que nous venons de détailler. L'équipement constitutionnel d'une personne en ces protéines permet d'expliquer le phénotype de radiosensibilité individuelle qui incarne le déterminant majeur de la réponse tissulaire aux radiations. Il y a un siècle fut en effet cliniquement objectivée une variabilité interindividuelle de

réponse tissulaire aux radiations lorsqu'un traitement identique en tout point était délivré à différents patients (182).

4. La radiosensibilité individuelle

La réponse interindividuelle de la population générale à une dose standardisée de radiations ionisantes suit également une courbe gaussienne, caractérisée par une valeur moyenne et sa déviation standard (σ) (183) (Figure 15).

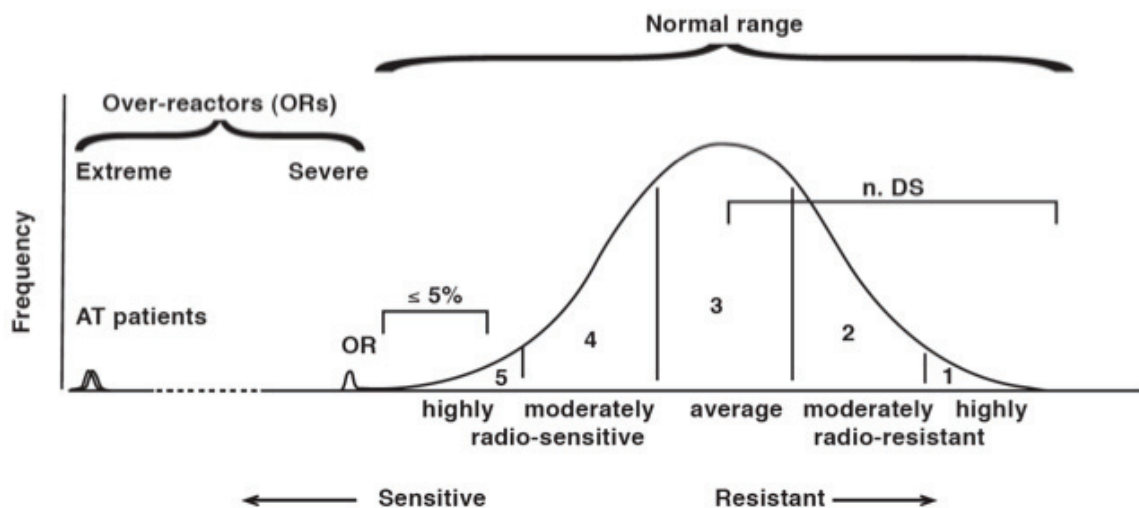


Figure 15 : Répartition de la radiosensibilité individuelle au sein de la population générale ; adaptée de (183). Les sujets souffrant de répatose se projettent à l'extrême gauche de cette courbe (*overreactors*). Les doses maximales recommandées sur les OAR prescrites sont calquées sur les 5% de patients réputés radiosensibles, sujets à des réactions inhabituellement sévères.

En dépit des termes définis par les pionniers, les radiobiologistes et les radiothérapeutes désignèrent dès les années 1930 sous le même terme de radiosensibilité individuelle à la fois le risque de toxicité tissulaire et celui de cancer radio induit. Une telle confusion pose le problème de la compréhension du lien possible entre radiosensibilité et prédisposition au cancer. Ce lien est complexe : les syndromes qui caractérisent une grande radiosensibilité, comme l'ataxie télangiectasie, sont associés à de fortes prédispositions au cancer. 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. Par ailleurs ces deux effets ne se produisent dans les mêmes conditions d'exposition.

Récemment le terme de radioesthésie a été introduit pour individualiser la susceptibilité carcinogénétique radio induite.

La radiosensibilité individuelle représente la variabilité de la sévérité des réactions tissulaires pour un même niveau de dose au sein de la population. La radioesthésie se réfère aux différences inter individuelles de susceptibilité au cancer. Ces deux phénotypes partagent des mécanismes moléculaires, ouvrant la perspective d'un test diagnostique unique.

4.1. Description historique (Figure 16)

En 1911 Bouchacourt approcha ce concept de radiosensibilité individuelle après avoir observé des réactions cutanées différentes entre les deux personnes d'un couple irradié à visée "dépilatoire" dans les mêmes zones anatomiques et à la même dose (184).

Cette observation fut confirmée et dénommée "idiosyncrasie" suite aux travaux de Bergonié avant d'être battue en brèche, car mise sur le compte d'une incertitude de dose délivrée, chez les patients non porteurs de maladies héréditaires. Son existence fut ainsi marginalisée au fil du temps dans les pratiques d'irradiation médicale. Des doses standard de RT sont ainsi prescrites depuis les années 1950 et ce malgré les toxicités inhabituelles touchant 5 à 10% des patients.

Pourtant, Dutreix évaluait la radiosensibilité individuelle des patients porteurs d'anémie de Fanconi (petite taille, malformations faciales, hypoplasie médullaire congénitale, radiosensibilité, prédisposition leucémogène) avant qu'ils ne soient irradiés in toto en vue d'une transplantation médullaire. Il réalisait une contact thérapie sur une petite zone de l'avant bras et cotait l'érythème aigu radio induit et adaptait ainsi la dose qui allait être délivrée pour le conditionnement de la greffe (185).

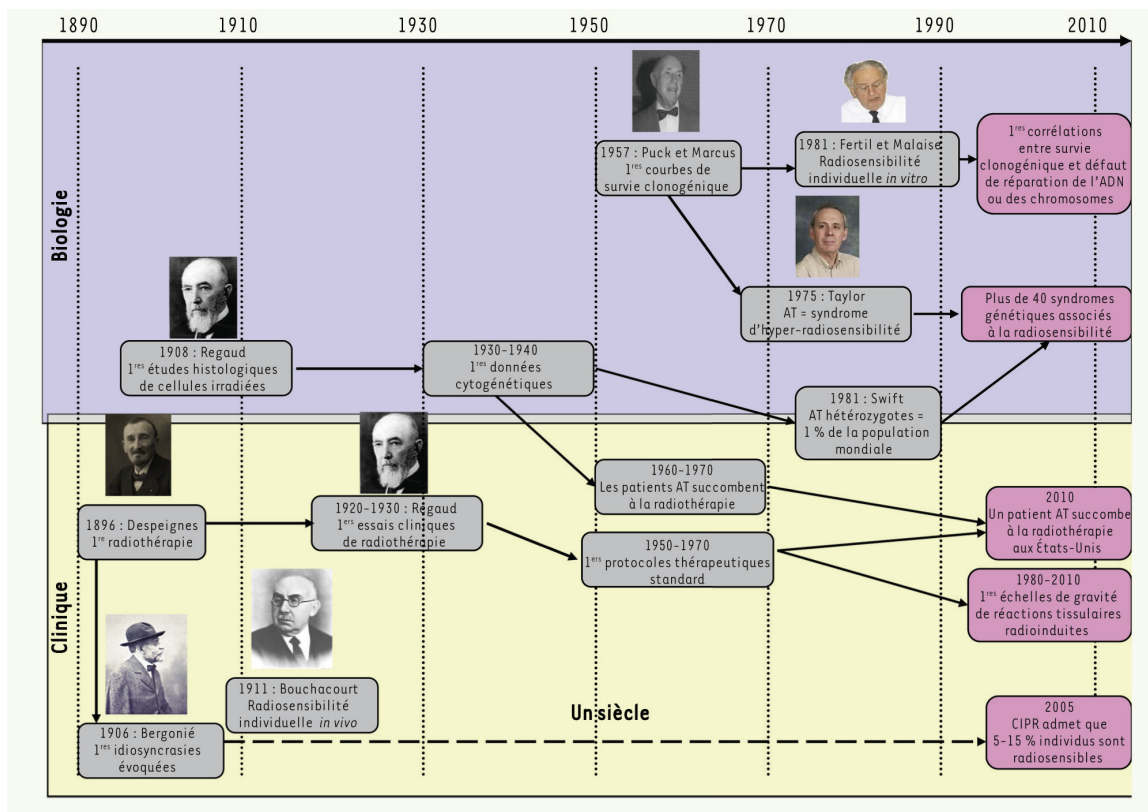


Figure 16 : Histoire du concept de radiosensibilité individuelle : quand biologie et clinique se renvoient la balle ; d'après (186)

Tucker et Little aux Etats-Unis, Deschavanne et Fertil en France ont recensé au moyen de tests clonogéniques sur fibroblastes, les pathologies congénitales associées à une hyper radiosensibilité pouvant comprendre un sur risque carcinogénétique radio induit : on les appelle réparatoses et nous les passerons en revue dans le chapitre suivant (15, 151, 187-190).

Dans les années 1980, les tests clonogéniques ont permis de démontrer des différences de radiosensibilité individuelle entre patients présentant ou non des réparatoses. Il fut entrevu dès ce moment la possibilité de développer des tests prédictifs pour la population et pas seulement pour les individus souffrant d'affections génétiques (191, 192).

Aux Etats-Unis, Tucker et Turesson ont étudié de manière extensive le déterminisme du facteur individuel dans les toxicités cutanées post RT chez des patients "normaux" (15, 16, 193).

Il fallut attendre les années 2000 et une étude menée chez des patientes traitées pour cancer du sein bilatéral, ayant nécessité une irradiation bilatérale de la chaîne mammaire interne ayant entraîné l'apparition de télangiectasies cutanées. Les variations de la réponse cutanée du second champ traité apparaissent liées pour une part d'au moins 90% (IC_{95%} : 65%-100%) à la réponse cutanée observée au cours du premier traitement. Ce fait suggère que les facteurs génétiques sont au premier plan dans la toxicogénèse radio induite (194).

4.2. Pathologies humaines associées à une radiosensibilité individuelle accrue

Quelques maladies héréditaires, toutes très rares, sont associées à une hypersensibilité aux radiations ionisantes. Le plus souvent, cette hypersensibilité est une découverte fortuite lors d'une RT anormalement mal tolérée. Ces maladies sont le plus souvent autosomiques et récessives et leur phénotype est très varié. Elles sont liées à des dysfonctionnements de la réparation des dommages de l'ADN qu'ils soient chimio- ou radio induits. Les défauts de suture seraient plutôt associés à une forte immunodéficience et une radiosensibilité de modérée à forte alors que le manque de contrôle de la recombinaison (non homologue) serait plutôt associé à une forte prédisposition au cancer et une radiosensibilité de modérée à faible. Le syndrome humain associé à la plus forte radiosensibilité est l'ataxie télangiectasie homozygote que nous avons précédemment détaillée. La SF2 de fibroblastes de patients ataxiques est d'environ 2%. Tous les autres syndromes se caractérisent par une radiosensibilité moins marquée. Nous les avons passés en revue en effectuant une analyse de la littérature (Tableau 10).

Nous pouvons constater dans ce tableau que la majorité des syndromes associés à une radiosensibilité accrue présentent un déficit dans la signalisation ou la réparation des CDB.

Les toxicités tissulaires radio induites sont observées relativement beaucoup plus fréquemment que les réparatoses chez nos patients et pourraient être liées à des mutations hétérozygotes qui n'altèrent pas drastiquement les fonctions essentielles

des gènes de réparation, atténuant le phénotype observé dans les réparatoses homozygotes. Environ 5% de la population serait concernée. Les mutations hétérozygotes d'ATM représentent à elles seules 1% de la population mondiale (195-197).

Toutefois il existe plusieurs exemples de mutations de protéines cytoplasmiques qui nous intéresseront par la suite.

	OMIM	protéine impliquée	rôle	radiosensibilité	SF2 (%)	prédisposition au cancer	anomalies associées	réf
Ataxie télangiectasie	208900	ATM	reconnaissance, la signalisation et la réparation des cassures de l'ADN	groupe III	1-5	Lymphomes, leucémies, sein	ataxie, télangiectasie, immunodéficience, retard mental, vieillissement accéléré, taches café au lait	(151)
Syndrome Nimègue de Nimègue	251260	NBS1	complexe MRN	groupe III	2-6	Lymphomes, gliomes	microcéphalie, retard mental, retard statural, immunodéficience, stérilité	(198)
Syndrome de Nimègue-like	613078	RAD50	complexe MRN	groupe III	5-9	Lymphomes	microcéphalie, retard mental, retard statural, immunodéficience	(199)
Syndrome ATLD	604391	MRE11	complexe MRN, activité endonucléase	groupe II	15-40	Lymphomes	phénotype AT sans télangiectasie ni immunodéficience	(200)
Déficience en ligase IV	606593	LIG4	suture, recombinaison VDJ	groupe III	5-9	Lymphomes	Déficit immunitaire combiné sévère (DICS), pancytopénie, retard de croissance, dysmorphie faciale	(201)
Déficience en DNA-PKcs		DNA-PKcs	suture, recombinaison VDJ	groupe III	8-20		DICS	(202)
Syndrome Artémis	602450	Artemis	suture, recombinaison VDJ	groupe II	20-40		DICS, érythrodermie, hépato-splénomégalie, adénopathies, alopecie	(203)
Syndrome Cernunnos	611291	XLF/Cernunnos	suture, recombinaison VDJ	groupe II	20-40		DICS, microcéphalie, retard de croissance, dysmorphie faciale	(204)
Syndrome d'Omeinn	603554	RAG1, RAG2	suture recombinaison VDJ	groupe II	30-50		DICS, érythrodermie, hépato-splénomégalie, adénopathies, inflammation chronique	(205)
Agammaglobulinémie liée à l'X (Bruton)	300755	tyrosine kinase BTK	suture recombinaison	groupe II	30-50		DICS	(206)

			VDJ								
Syndrome de Riddle	611943	RNF168	ubiquitine-ligase ciblant H2A	groupe II	10-20	hémopathies	microcéphalie, retard mental, retard statural, immunodéficience	(207)			
Syndrome de Cornelia de Lange	122470	NIPBL, SMC1A, SMC3, RAD21	complexe cohésines	groupe II	20-70	hémangioendothéliome, néphroblastome	dysmorphie faciale, déficit intellectuel, retard de croissance malformations des extrémités et viscérales (cardiaques, rénales...), RGO	(208)			
Anémie de Fanconi	227650	protéines FANCC dont BRCA2	recombinaison homologue, réparation des pontages interbrins, cycle cellulaire	groupe II	20-40	hémopathies, carcinomes épidermoïdes ORL, oesophagiens, vulvaires	chimiiosensibilité, insuffisance médullaire microcéphalie, malformations viscérales, retard statural-pondéral, surdité, stérilité, taches café au lait	(209)			
Syndrome BRCA1	113705	BRCA1	recombinaison homologue, réparation des pontages interbrins, cycle cellulaire	groupe II	20-40	sein, ovaire, colon, pancréas, prostate		(210)			
Progeria	176670	Lamine A	organisation de la lamina nucléaire	groupe II	8-19	/	vieillessement accéléré, retard statural-pondéral, alopecie, lipodystrophie, sclérodémie	(211)			
Chorée de Huntington	143100	huntingtine	transport vésiculaire	groupe II	18-30	/	neurodégénérescence : chorée, dystonie, troubles de la coordination, déclin cognitif, troubles du comportement	(212)			
Syndrome d'Usher	276900	Protéines USH	?, morphogénèse des cils des	groupe II	15-20	/	neurodégénérescence : surdit-mutité, rétinite pigmentaire	(213)			

			récepteurs sensoriels					
Xeroderma pigmentosum	278700	Protéines XP	Hélicases, nucléases NER	groupe II	15-30	carcinomes basocellulaire, carcinomes épidermoïdes, mélanomes	photosensibilité, génodermatose, surdité, microcéphalie, kératite, cataracte	(214)
Syndrome de Cockayne	216400	Protéines CS	Hélicases, nucléases NER	groupe II	15-30	/	photosensibilité, génodermatose, retard de croissance, rétinite pigmentaire, surdité, vieillissement accéléré	(215)
Trichothiodystrophie	601675	TTD	Hélicases, nucléases NER	groupe II	15-30	/	génodermatose, photosensibilité, retard de croissance, retard mental	(216)
Syndrome de Gardner (Polypose adénomateuse familiale),	175100	APC	MMR	groupe II	20-30	colon-rectum duodénum, thyroïde, ostéomes du crâne, kystes épidermoïdes, fibromes, tumeurs desmoïdes	génodermatose	(217)
Syndrome de Turcot	276300	hMSH2	MMR	groupe II	20-30	polypose intestinale, tumeurs cérébrales - médulloblastomes, hémopathies malignes, colon-rectum, tumeurs embryonnaires, rhabdomyosarcomes	taches café au lait	
Syndrome Rothmund-Thomson	268400	RecQ4	Hélicase RecQ	groupe II	30-50	sarcomes, ostéosarcomes	généodermatose, vieillissement accéléré, télangiectasies, hyper- et hypo-pigmentation, anomalies squelettiques congénitales, retard de croissance	(218)
Syndrome de Werner	277700	WRN (RecQ12)	Hélicase RecQ	groupe II	30-50	sarcomes, ostéosarcomes,	généodermatose, vieillissement accéléré,	(219)

Syndrome de Bloom	210900	BLM (RecQL3)	Hélicase RecQ	type	groupe II	30-50	sarcomes, carcinomes, lymphomes, leucémies,	cataracte bilatérale, retard de croissance, chimiosensibilité	(220)
Syndrome de Seckel	210600	ATR	cycle cellulaire, réparation des CSB et des fourches de réplication bloquées		groupe II	60-80	/	Microcéphalie marquée, retard mental, nanisme primordial, dysmorphie faciale	(221)
Neurofibromatose type 1	162200	neurofibromine	inhibiteur de la voie Ras		groupe II	30-60	neurofibromes, MPNST, gliomes	tâches café au lait, génodermatose, nodules de Lisch	(222)
Naevomatose basocellulaire (Gorlin)	109400	PTCH1	récepteur de Sonic Hedgehog (développement)		groupe I	80-100	médulloblastome, carcinome basocellulaire, sein, colon, tumeurs kératocystiques odontogéniques	génodermatose, macrocéphalie, anomalies du squelette	(223)
Syndrome des naevi dysplasiques familiaux	155600	p16 et p14ARF	régulation du cycle cellulaire		groupe I	80-100	mélanome, pancréas, sein, myélome	génodermatose	(224)
Epidermodysplasie verruciforme	226400	EVER1, EVER2	protéines membranaires impliquées dans l'homéostasie du zinc (barrière HPV)		groupe I	80-100	carcinomes cutanés	génodermatose,	(225)
Dyskératose congénitale	615190	RTEL1	hélicase régulant l'élongation télomérique		groupe I	80-100	carcinome épidermoïde des VADS, de l'œsophage, du vagin ou du col utérin	génodermatose, vieillissement prématuré, atrophie des voies lacrymales, stérilité, retard de croissance,	(226)

4.3. Impact sociétal dans les domaines des fortes et faibles doses

La mise en place de tests diagnostiques de radiosensibilité individuelle permettrait de créer une nouvelle ligne de défense pour différentes populations : patients traités par RT, patients ayant recours à l'imagerie diagnostique utilisant des radiations ionisantes, travailleurs du nucléaire.

4.3.1. En RT

Sur 380 000 nouveaux cas de cancers par an, la moitié des patients sont traités par RT. 10 à 15% sont exposés à une toxicité aiguë inhabituelle et 5% à une toxicité tardive pouvant entraîner des séquelles parfois létales (10, 12-15). L'impact de la radiosensibilité individuelle dans la survenue de ces toxicités tissulaires dans les zones exposées intentionnellement à de fortes doses semble prépondérant à côté des déterminants extrinsèques que nous avons détaillés plus tôt.

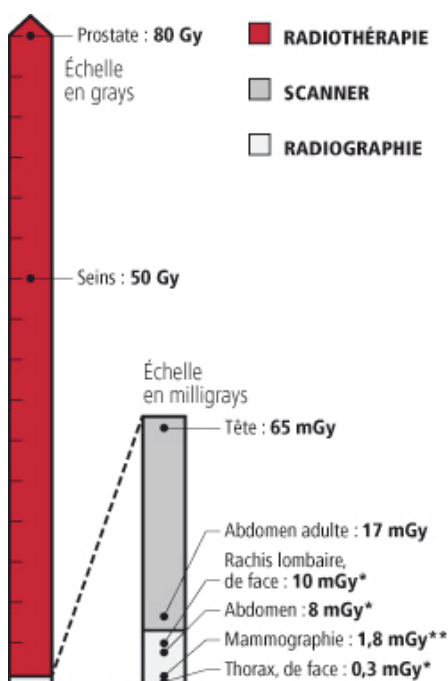


Figure 17: Doses délivrées par les principales interventions médicales (source ASN).

Durant ces mêmes traitements, un volume plus moins important de tissus sains est exposé de manière indésirable à de faibles doses en dehors des champs de traitement par : (1) le rayonnement diffusé dans le patient à partir des faisceaux de traitement, (2) le rayonnement diffusé à partir de l'accélérateur, principalement ses collimateurs, les filtres, les caches et les lames et (3) l'irradiation de « fuite » de la tête de la machine. Ces tissus sains présentent ici un risque de transformation tumorale. En 2007, l'analyse de 11 cohortes de patients avait permis d'estimer que le risque relatif de présenter un second cancer radio induit était de 1,31 (IC95 % : 1,15-1,49), comparé à la population générale (230). Ces seconds cancers surviennent

préférentiellement à proximité des volumes ayant reçu une dose intermédiaire ou élevée, définie comme une dose allant de 5 à 50 Gy, voire en plein volume de traitement. La maîtrise du volume irradié à dose moyenne à faible constitue un enjeu dans le développement des techniques avancées comme nous le reverrons.

4.3.2. En radiologie, chez les travailleurs du nucléaire et les spationautes

Pour ces trois populations, se pose uniquement la problématique de la prédisposition individuelle aux cancers radio induits et de l'individualisation des mesures de radioprotection. Chez l'adulte, les seuils pour lesquels existe un risque d'émergence de leucémies et de cancers solides radio induits sont généralement fixés à 100 et 200 mSv de dose efficace respectivement (231). Toutefois ces seuils ont été déterminés à partir de données épidémiologiques acquises à partir de larges cohortes dans lesquelles les possibles différences individuelles n'ont pas fait l'objet d'une analyse spécifique.

De façon sommaire, la cancérogenèse radio induite est la conséquence de mutations radio induites compatibles avec la survie cellulaire et transmises aux générations de cellules filles. Les remaniements génomiques provoqués par les radiations ionisantes étant essentiellement dus aux CDB mal réparées, l'origine même de ces mutations radio induites est très fortement létale pour les cellules et l'occurrence d'une survie cellulaire fertile dans ce contexte est très faible. De plus les mécanismes génétiques en cause correspondent à des remaniements à grande échelle avec des pertes importantes de matériel génique. La conséquence n'est donc pas un « gain » de fonction, comme peut en induire la mutation ponctuelle d'un proto-oncogène par un agent carcinogène chimique, mais une perte de fonction, notamment de contrôle. Il s'agit donc d'événements récessifs qui ne vont s'exprimer qu'à la condition de la perte cumulée de l'autre allèle et que la fonction invalidée corresponde à une régulation négative de la prolifération cellulaire. C'est pourquoi la cancérogenèse radio induite est faiblement probable, plutôt observée aux faibles doses (de quelques cGy à quelques Gy), est d'expression très retardée et caractérisée par l'instabilité génomique et la perte de fonctions anti oncogènes (232).

Nous avons pu montrer que le taux de mauvaise réparation d'une lésion de l'ADN peut rester très élevé, même en deçà de 100 mGy, chez des sujets prédisposés aux cancers (233). En effet, les CDB induites par des faibles doses de rayons X (jusqu'à 1 mGy) apparaissent plus sévères qu'à fortes doses et dépendent fortement du statut génétique (234-236). Les mutations de certains gènes de réparation ou de signalisation des dommages de l'ADN comme BRCA1 , BRCA2 et ATM confèrent un risque de cancer radio induit significativement accru par rapport aux témoins, même à doses inférieures à 100 mGy (182).

Notre groupe a en outre démontré que la susceptibilité individuelle à la carcinogénèse radio induite est décuplée lors d'une exposition répétée à de faibles doses (237). Dans ce cas, il ne faudrait pas négliger une augmentation significative du risque pour les patients jeunes à haut risque familial (235). Parallèlement à la dose absolue, le débit de dose apparaît comme un facteur essentiel dans la promotion de l'hyper radiosensibilité décrite aux faibles doses sur les courbes de survie (238).

Ici encore, l'impact sociétal potentiel apparaît majeur. En radiodiagnostic, la répétition d'examens irradiants pose la question de l'évaluation précise des expositions et des risques de cancers radio induits associés, notamment chez les jeunes enfants (239). Dans le cadre du dépistage du cancer du sein, plusieurs millions de femmes effectuent chaque année un examen mammographique. Le dépistage organisé est prévu pour 7,5 millions de femmes entre 50 et 74 ans, avec un examen tous les 2 ans. Par contre, le dépistage du cancer du sein chez les femmes plus jeunes n'est pas consensuel, car le risque potentiel de cancer radio induit n'est pas négligeable et ce d'autant plus que cela concernerait en premier lieu des femmes prédisposées au cancer (235).

Dans le cadre des activités de l'industrie nucléaire française, environ 30 000 travailleurs sont exposés à des doses allant de 1 à 14 mSv par an (données 2010-2011) mais, contrairement à la RT et la radiologie, aucune information sur les statuts génétiques à risque n'est disponible (240). Si la même proportion de cas radiosensibles (quelques pourcents) est considérée, le nombre des travailleurs de l'industrie nucléaire potentiellement radiosensibles pourrait atteindre quelques centaines. En cas d'accident entraînant un dépassement des normes, pouvoir

identifier parmi les travailleurs ceux qui nécessitent un traitement et un suivi particulier serait utile.

A l'orée de la conquête martienne par l'Homme, les agences spatiales internationales se tournent vers les radiobiologistes pour tenter de comprendre et d'estimer le risque lié à l'exposition aux radiations ionisantes. Au cours des vols interplanétaires, les spationautes sont en effet exposés à un rayonnement secondaire issu d'interactions nucléaires entre le rayonnement cosmique et le blindage des engins spatiaux. Les rayons cosmiques galactiques sont composés de 2% de photons et électrons, 85% de protons, 12% de noyaux d'hélium et 1% d'ions lourds (241). La dose quotidienne moyenne atteint 2,5 mSv voire davantage en cas d'éruption solaire (2). La *NASA's Longitudinal Study of Astronaut Health* a décrit la morbidité aiguë et chronique et la mortalité chez les astronautes de la NASA appariés à des sujets témoins (242). Les astronautes ont présenté un taux de mortalité spécifique (TMS) par cancer (à âge apparié) supérieur au groupe témoin (TMS = 345; IC_{95%} = 69,5-756,2), mais cette différence est apparue non significative. Les astronautes exposés à une dose totale de plus de 8 mSv ont présenté des cataractes plus précoces et fréquentes (243). La connaissance de la radiosensibilité individuelle pourrait permettre de sélectionner les individus les plus radiorésistants afin d'optimiser les chances de succès des missions habitées.

Pour toutes ces raisons, l'Autorité de Sûreté Nucléaire (ASN) a considéré les recherches sur le facteur individuel comme prioritaires dans les années à venir. Cette volonté apparaît dans plusieurs rapports de l'ASN, dans les interventions au Sénat et à l'Assemblée Nationale des Commissaires de l'ASN (rapports de l'ASN 2011 et 2012). Il existe un intérêt majeur à identifier les sujets à risque de toxicité inhabituellement sévère.

4.4. Rationnel de développement des tests prédictifs de radiosensibilité

Pour qu'un test prédictif de la radiosensibilité individuelle soit valide, il doit satisfaire à de multiples critères :

- Les mesures in vitro répétées devraient objectiver une variabilité interindividuelle plus large que la variabilité intra individuelle avec un très haut niveau de significativité statistique.
- Deux formes de variabilité intra individuelle doivent être explorées:
 - (a) la répétition du test de radiosensibilité sur une souche cellulaire dérivée du même échantillon peut révéler une première forme de variabilité intra individuelle du fait de la technique elle-même. Cette variabilité est appelée "bruit du test" et peut être réduite par des mesures répétées indépendantes. Le pouvoir prédictif du test peut être amélioré lorsque les procédures sont répétées sur le même échantillon à plusieurs reprises ou sur plusieurs échantillons du même individu.
 - (b) les test répétés sur plusieurs échantillons du même patient prélevés à différents moments peuvent révéler une seconde forme de variabilité intra individuelle du fait de l'hétérogénéité des populations cellulaires testées ou, moins probablement, de l'émergence d'une sous population de radiosensibilité différente.
- Une forte corrélation entre le paramètre de radiosensibilité mesuré et la sévérité de la réaction tissulaire doit être affichée en tenant compte du "bruit du test". Les valeurs relatives du bruit et de la variabilité biologique réelle déterminent la sensibilité et la spécificité du test (Tableau 11).

	test de radiosensibilité anormal	test de radiosensibilité normal	
toxicité anormale	A	B	$Se = \frac{A}{A+B}$
réaction tissulaire normale	C	D	$Sp = \frac{C}{C+D}$
	$VPP = \frac{A}{A+C}$	$VPN = \frac{B}{B+D}$	

Tableau 11 : Tableau de contingence applicable aux tests prédictifs de radiosensibilité individuelle

- La force de l'association entre le paramètre biologique de radiosensibilité et la toxicité doit être démontrée au moyen d'une étude minutieuse où tous les autres facteurs de confusion connus sont ajustés. Au besoin, le test évalué doit être comparé au test de radiosensibilité individuelle de référence (SF2).
- Le test doit avoir été éprouvé sur une large gamme de doses compatibles avec la réalité clinique, un nombre d'individus suffisant et une large gamme de radiosensibilité.

- Si les données issues du test sont dépendantes du modèle tissulaire, il est utile de savoir si cette dépendance change la corrélation avec la radiosensibilité lorsque l'on change de tissu.
- Le test de radiosensibilité devrait être relativement simple et rapide, afin que les résultats soient disponibles dans un délai relativement court afin de prendre une décision radiobiologique préalablement au traitement.

4.5. Etat de l'art sur la thématique des tests de radiosensibilité individuelle

L'ensemble des voies de signalisation connectées à la voie de signalisation des CDB peut être explorée pour développer des tests de radiosensibilité individuelle (Figure 18).

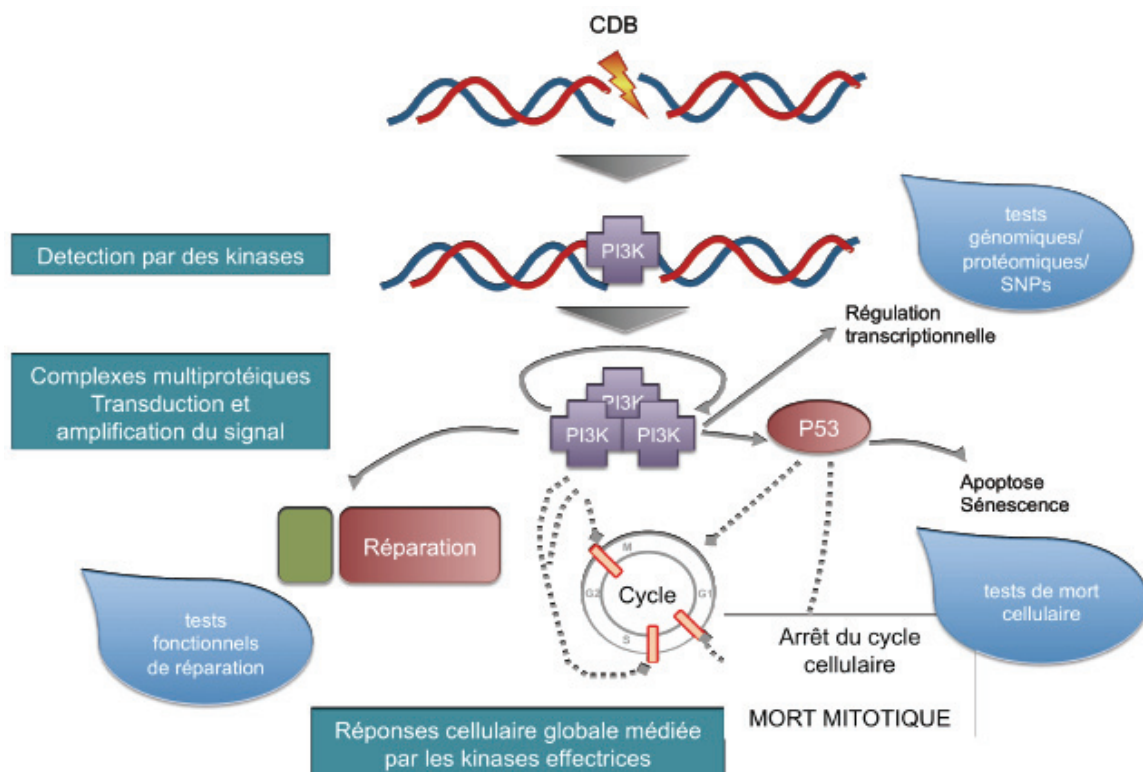


Figure 18 : Distribution des tests prédictifs existants au sein de la voie de la réponse cellulaire aux dommages radio induits de l'ADN

Les tests prédictifs de la radiosensibilité doivent suivre une méthodologie précise et rigoureuse en vérifiant à la fois la corrélation QUANTITATIVE avec la radiosensibilité et l'évolution des phénomènes avec la dose.(244, 245).

4.5.1. Tests de fonctionnalité de la réponse cellulaire aux dommages radio induits de l'ADN

4.5.1.1. Tests clonogéniques

Au début des années 1990, un certain nombre d'études a démontré une corrélation entre la mesure de la radiosensibilité in vitro par tests clonogéniques sur fibroblastes issus de biopsies cutanées et le grade de toxicité tardive chez les patients traités par RT (195, 246-251).

Les résultats des tests clonogéniques, explicités dans la première partie du manuscrit, reflètent un ensemble de phénomènes biologiques : mort mitotique surtout, apoptose, réparation, pouvoir réplcatif d'une cellule après irradiation...

Ces tests clonogéniques ont été ensuite simplifiés, se focalisant sur un des mécanismes biologiques de la réponse cellulaire aux dommages radio induits de l'ADN à l'échelon moléculaire ou cellulaire.

4.5.1.2. Test des micronoyaux

La mort mitotique est la voie de mort radio induite la plus importante pour tous les tissus à l'exception des lymphocytes. Le taux de micronoyaux radio induits a été quantitativement corrélé à la radiosensibilité depuis les années 1960 grâce à un protocole simple et robuste consistant à bloquer le processus d'exonucléose par des drogues comme la cytochalasine B (252).

Une corrélation positive a été observée entre le nombre de micronoyaux et la toxicité radio induite des patients (253).

4.5.1.3. Test cytogénétiques

L'induction de cassures chromosomiques apparut rapidement proportionnelle à la dose ainsi que celle des micronoyaux dont elles sont la cause (254). Toutefois, un facteur limitant l'intérêt de ces tests cytogénétiques est la période de temps post irradiation (quelques heures) nécessaire pour obtenir des métaphases, indispensables à la visualisation de chromosomes. En effet, au cours de cette période de temps, certains phénomènes de réparation peuvent se produire et biaiser le résultat final. Afin d'éviter ce biais, la technique de condensation prématurée des chromosomes (PCC ou *premature chromosome condensation*) a été mise au point. La PCC consiste à faire apparaître plus rapidement les fragments chromosomiques en fusionnant la cellule testée avec une cellule en mitose. L'hétérodikaryon ainsi formé permet l'échange des facteurs mitotiques é la cellule en G0/G1 et produit alors une condensation prématurée de la chromatine. La PCC a permis d'établir une corrélation entre cassures chromosomiques non réparées et radiosensibilité (187). C'est grâce à cette technique que Cornforth et Bedford (1987) démontrèrent avec une lignée fibroblastique humaine qu'une cassure chromosomique non réparée par cellule suffit à entraîner un évènement létal (255).

Concernant les aberrations chromosomiques, elles sont soit stables (translocations), soit instables (chromosomes di centriques, acentriques, anneaux). L'incidence des di centriques et des fragments acentriques est généralement proportionnelle à la dose. Signalons que les tests cytogénétiques développés par l'IRSN sont les seuls tests de dosimétrie biologique accrédités en France La technique FISH a permis de dénombrer avec précision la plupart des types d'aberrations. Cette technique associée ou non à la PCC a permis d'établir une corrélation entre les cassures chromosomiques et la radiosensibilité (256).

Cette méthode fut validée sur lymphocytes chez des patients traités par RT (257) et a pu servir de référence pour valider d'autres tests génomiques (258).

Malgré leurs très bonnes performances, la mise en culture, la multiplicité des manipulations et le temps d'incubation des cellulesensemencées s'avèrent relativement chronophage et rendent ces tests impossibles à réaliser en routine.

Il apparut donc logique de s'intéresser aux mécanismes moléculaires de la réponse cellulaire aux dommages radio induits de l'ADN et en particulier à la réparation puisque rappelons qu'il existe un lien quantitatif entre CDB non réparées, cassures chromosomiques et mort cellulaire radio induite. Il a été démontré que les CDB étaient la lésion-clé de la létalité radio induite (136).

Les syndromes qui s'accompagnent d'une radiosensibilité sont aujourd'hui essentiellement associés à des mutations homozygotes ou hétérozygotes de gènes intervenant dans la signalisation et la réparation des dommages de l'ADN, et notamment des CDB comme nous l'avons évoqué. Ces dernières entraînent une létalité cellulaire si elles ne sont pas réparées, et une instabilité génomique si elles sont mal réparées. Aucune corrélation n'existe dans la littérature entre la radiosensibilité et les défauts de réparation des dommages de bases ou de CSB.

Une fois les marqueurs d'intérêt définis, les CDB, il faut choisir parmi les techniques d'analyse disponibles celles qui sont les plus appropriées. Des tests explorant la fonctionnalité de la réparation des CDB ont été inter comparés dans une des études princeps de notre groupe (259).

Les CDB fragmentent l'ADN. Les premières techniques de mesure des CDB ont été basées sur la discrimination des fragments radio induits d'ADN en fonction de leur taille. Cela a été notamment le cas de la sédimentation en gradients de sucrose, de l'élution neutre et de l'électrophorèse en champs pulsés. Un tel principe a l'avantage de mesurer la réparation des CDB indépendamment de toutes voies moléculaires de réparation quel que soit le temps post irradiation. En revanche, ces techniques ne permettent pas d'évaluer la qualité de la réparation, c'est à dire son caractère fidèle ou bien fautif. Les CDB mais surtout les CSB radio induites, plus nombreuses, provoquent dans certaines conditions une augmentation du noyau cellulaire due à la décondensation de la chromatine.

4.5.1.4. Test des comètes

La technique du halo consiste, à l'aide d'intercalants fluorescents, à quantifier une telle augmentation du noyau. La technique de la comète combine l'électrophorèse et

la technique du halo toutes deux appliquées individuellement à chaque cellule. Les données issues de la technique de la comète sont généralement fournies sous la forme du produit de l'augmentation de la taille du noyau (tête de comète) par la distance de migration des fragments de l'ADN (queue de comète).

Un lien avec la radiosensibilité a pu être obtenu avec cette technique pour les fibroblastes (260) y compris chez des patients soumis à une RT (261).

Toutefois, comme la décondensation de la chromatine et la religation des brins d'ADN ne sont pas organisées par les mêmes voies protéiques, la technique de la comète ne fournit pas une mesure directe du rythme de réparation des CDB mais une estimation globale de la gestion des CSB et des CDB, ce qui pose souvent un problème d'interprétation des données puisqu'aucune corrélation n'existe dans la littérature entre la radiosensibilité et les défauts de réparation des dommages de bases ou de CSB, ce que confirment les données moléculaires issues des réparatoses humaines.

4.5.1.5. Fonctionnalité de la réparation des CDB

Dès 2003, grâce à l'immunofluorescence indirecte, il devint possible de suivre précisément et en temps réel dans le noyau et pour un large spectre de dose, la cinétique d'apparition/disparition des acteurs protéiques de la réparation sous forme de foci (234). En particulier, il existe une relation linéaire entre le nombre de CDB et le nombre de foci γ H2AX et la SF2 apparaît comme inversement proportionnelle au taux de CDB non réparées reconnues par la phosphorylation de H2AX (259).

Ce test à un marqueur fut concluant à la fois sur lymphocytes et fibroblastes (262).

Toutefois le signal de fluorescence et la lisibilité des foci γ H2AX peuvent être perturbés un chevauchement des spectres de fluorescence nommé *bleed-through* (142) ou encore par des dysfonctionnements de la chromatine dus au traitement ou au statut génétique. D'autre part les foci γ H2AX disparaissent à un rythme normal dans certains cas de radiosensibilité individuelle. (postulat de la thèse qui nous a conduit à fonder un modèle sur 2 puis 3 marqueurs) Le test des foci MRE11 permet la quantification de la « mauvaise » réparation, responsable de l'instabilité génomique mais participant aussi à la réparation globale et donc aux processus de

radiorésistance. Le double test γ -H2AX-MRE11 nous a donné alors une vision quantifiée de la radiosensibilité et de l'instabilité génomique radio induite. La prise en compte de pATM a permis d'affiner davantage la, prédiction des groupes de radiosensibilité et nous a orienté vers l'étude du transit cyto-nucléaire.

4.5.2. Tests intégratifs

4.5.2.1. Tests génomiques

La nature multi génique de la réponse aux radiations et l'influence probable de facteurs épigénétiques rendent insuffisante la seule connaissance du génome d'une cellule pour prédire son comportement sous irradiation. Au cours de la dernière décennie, près de 60 études méta analysées ont porté sur les associations possibles entre les diverses variantes d'expression pan génomiques et le risque de réactions indésirables après la RT (263). Bien que de nombreux résultats positifs ont été signalés, des résultats incohérents et non reproductibles sont rapportés. Cela peut sans doute être attribué à certaines lacunes méthodologiques, notamment le manque de puissance statistique et la multiplicité des techniques pour détecter de petites tailles d'effet. Les mutations d'un seul gène ne peuvent expliquer ni la radiosensibilité ni le continuum des réponses. Des études pan génomiques impliquant des milliers de patients sont en cours, comme celle orchestrée par le groupe GENEPI. Ces approches peuvent toutefois permettre d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la réponse cellulaire aux dommages radio induits de l'ADN ou la physiopathologie des effets tardifs (264).

4.5.2.2. Tests protéomiques

L'ensemble du protéome est analysé par cette approche, sans hypothèse a priori. La plupart des études protéomiques appliquées à la RT ont porté sur l'effet du rayonnement sur le protéome dans son ensemble, dans le but d'identifier des marqueurs bio dosimétriques, sans lien avec la toxicité radio induite. 173 protéines humaines associés à l'exposition aux rayonnements ionisants ont été identifiées dans les échantillons sériques. Seulement 29 de ces protéines ont été identifiées dans les échantillons de patients irradiés (265).

Par technique de désorption-ionisation de surface par laser - TOF, une série de marqueurs sériques qui sont communs à l'ensemble des patients a été identifiée chez 68 patients. Cette étude a montré que les modifications du protéome sérique pouvaient dépendre du site et de la tumeur irradiés. Cette étude n'a toutefois pas permis d'établir une corrélation entre la radiosensibilité des tissus normaux et la radio toxicité potentielle qui peut résulter de l'irradiation (266).

Une étude a été réalisée chez 20 patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) dont six ont présenté une toxicité pulmonaire radio induite de grade >2. Des échantillons sanguins ont été prélevés avant, pendant et 1 puis 3 mois après la RT. 76 protéines ont présenté un profil statistiquement discriminant entre les deux groupes de patients. Parmi ces protéines, trois ont été surexprimées chez les patients avec fibrose pulmonaire : le facteur C3 du complément, la chaîne α de la C4b-BP et la vitronectine. Il est important de noter que le niveau de ces trois protéines d'expression ne varie pas de façon significative entre les différents points temporels, ce qui indique que ces marqueurs ont une certaine valeur prédictive (267).

Ces résultats ont été confirmés une année plus tard sur une plus grande population. (48 patients) et à visée prédictive; du sang a été prélevé uniquement avant la RT (268).

L'étape pré analytique peut affecter les résultats finaux en introduisant des biais. Des problèmes d'extraction du protéome in toto ont été observés (de nombreuses protéines sont encore insolubles à des méthodes d'extraction). En outre, de nombreuses protéines qui régulent des fonctions intéressantes de la cellule sont présentes en faibles quantités, et par conséquent, les étapes d'enrichissement sont nécessaires à leur identification. D'autres techniques de criblage à haut débit sont amenées à se développer.

4.5.2.3. Tests de variabilité interindividuelle d'expression génique

Les nombreux travaux de génomique ont apporté la preuve de la grande variabilité génétique entre individus, dont témoignent les polymorphismes, ce qui a naturellement suscité l'engouement des radiobiologistes. Toutefois, les polymorphismes sont des mutations généralement ponctuelles fréquentes (touchant au moins 1% de la population) qui n'entraînent pas de changement fonctionnel significatif de la protéine. D'autre part, chaque individu porte environ 30 millions de polymorphismes (un toutes les 300 paires de bases), et il est donc peu probable qu'un seul polymorphisme puisse traduire toute la gamme de la radiosensibilité individuelle. Certains SNP combinés des gènes ATM, XRCC1, XRCC3, SOD2, RAD21, TGF- β 1 et PARP-1 ont pu être associés à une réponse anormale aux radiations (269-271). Les résultats de la recherche de polymorphismes potentiellement liés à la radiosensibilité sont contradictoires, et ce champ de recherches devra relever les défis bio statistiques et méthodologiques, ce d'autant que les polymorphismes sont quelquefois confondus avec de vraies mutations hétérozygotes (272).

4.5.3. Tests s'intéressant aux protéines de la fibrogénèse

Il s'agit d'une approche basée sur des protéines candidates, actrices de cette voie de signalisation, et dosées par méthode immuno enzymatique dans le sang des patients avant et pendant la RT. Elle a été principalement évaluée pour prédire la toxicité pulmonaire tardive dans le cancer bronchique (273-275).

4.5.4. Tests ciblant d'autres modalités de mort cellulaire

4.5.4.1. Apoptose lymphocytaire

En 1997, Ozsahin et al. ont mis au point un test de radiosensibilité rapide (<24 h) sur la base de l'apoptose lymphocytaire, réponse biologique se développant 6 à 72h après l'irradiation (276). Dans cette étude, après irradiation de sang entier (2 et 8 Gy), l'apoptose a été mesurée dans les cellules CD4⁺ et les lymphocytes T CD8⁺ par

cytométrie de flux sur la base de la diminution de la fluorescence de l'ADN nucléaire en raison de modifications de la chromatine spécifiques qui accompagnent l'apoptose.

Les auteurs ont montré que ce test rapide pouvait prédire la radiosensibilité individuelle et en ont confirmé la valeur prédictive dans une étude prospective impliquant 399 patients (277). Leurs résultats ont montré qu'une faible (<16 %) Apoptose Lymphocytaire Radio Induite (ALRI) était significativement corrélée avec les toxicités tardives de grade ≥ 2 ($p < 0,0001$). Cette étude a été réalisée sur une cohorte de patients souffrant de diverses localisations tumorales (sein, prostate, vessie, colon, poumon, lymphome), et les auteurs ont émis l'hypothèse que les lymphocytes peuvent servir de miroir de la radiosensibilité d'un grand nombre de tissus.

D'autres études ayant porté sur des localisations spécifiques ont confirmé ces résultats (278, 279) entérinés par une étude ancillaire d'un essai randomisé de phase II chez 150 patientes présentant une indication de RT postopératoire pour un cancer du sein localisé (280). Aucune patiente avec un ALRI supérieur 16 % n'a déclaré d'effet tardif.

Bien que ce test donne des résultats rapides, il doit encore être amélioré pour une utilisation clinique en routine.

Tout d'abord, il existe deux problèmes conceptuels : hormis pour les lymphocytes l'apoptose est une modalité de mort cellulaire radio induite minoritaire. Ensuite une corrélation inverse entre les taux d'ALRI et la radiosensibilité cellulaire a été observée et de nombreux artefacts techniques ont été soulevés (281). Il faut rappeler qu'il n'existe toujours pas de corrélation quantitative entre la survie clonogénique et l'apoptose. Les patients les plus radiosensibles déclenchent davantage et plus rapidement l'apoptose et la mort mitotique caractérisée par des micronoyaux, mais le passage en centrifugeuse à une vitesse inadaptée fait perdre tous ces corps apoptotiques et micronoyaux en sub-G1 et aboutit alors au paradoxe (biaisé) qu'il y en a davantage chez les patients radiorésistants. Le taux d'ALRI semble enfin varier en fonction de l'âge et du sexe (282).

Deuxièmement ce test n'est pas prédictif des effets précoces mais diagnostique les effets tardifs de grade élevé.

Troisièmement, les résultats ont montré que la grande majorité des patients atteints d'une faible ALRI ne développent pas de toxicité. Cependant, la valeur prédictive positive de ce test, c'est à dire sa capacité à déterminer quels individus développeront une toxicité tardive de grade élevé, reste faible. Enfin, le taux de cellules apoptotiques mesuré parmi les lymphocytes irradiés in vitro ne doit pas être proposé en tant que substitut de la radiosensibilité cellulaire, mais plutôt comme un indicateur du renouvellement cellulaire dans le tissu irradié.

4.5.4.2. Sénescence

Bien que l'impact de la mort mitotique sur l'effet létal des radiations ionisantes soit majeur pour des cellules qui peuvent se multiplier, la sénescence (c'est à dire l'arrêt irréversible des cellules en phase G1) est très souvent rencontrée dans les tissus irradiés en phase de quiescence.

D'ailleurs, la part relative de la mort mitotique et de la sénescence dans la mort clonogénique dépend du niveau de dose de radiation qui interdira ou non toute prolifération après l'irradiation. Par exemple, pour les fibroblastes de peau, la mort mitotique est prépondérante en deçà de 4 Gy alors que la sénescence s'observe pour des doses supérieures. Bien que l'expression de p21 soit généralement liée à la sénescence, le test idéal permettant de mesurer le taux de sénescence reste à développer. D'ailleurs, il n'y a toujours pas de corrélation quantitative publiée entre la sénescence et la radiosensibilité (283).

4.5.5. Autres tests

4.5.5.1. Test longueur des télomères

Une équipe a recherché une corrélation entre la longueur des télomères lymphocytaires et la susceptibilité au cancer du sein d'une part, et la sévérité des réactions radio induites d'autre part dans une cohorte de 24 patientes matchée à des témoins sains. Cette étude s'est révélée négative (284).

4.5.5.2. Test différenciation cellulaire radio induite

Une équipe a testé l'impact de la différenciation des fibroblastes dermiques sur la sévérité de la fibrose de patientes irradiées pour cancer du sein. Bien qu'une différence biologique interindividuelle soit apparue, celle-ci ne fut pas suffisante pour être prédictive de la fibrose radio induite (285).

4.5.6. Résultats publiés

Le tableau 12 expose les résultats des principaux essais cliniques de tests de radiosensibilité. Notons dès à présent que la plupart présentent des limites :

- absence de standardisation ou d'étude de transférabilité entre laboratoires
- reproductibilité rarement mentionnée
- rareté des études de validation
- hétérogénéité des cohortes de patients
- biais méthodologiques et manque de puissance

catégorie	test	type d'essai	localisation carcinologique	n	type cellulaire	toxicité	p*	réf	
clonogénique	classique	P	sein	88	F	A T	<0,005 NS	(286)	
	dilution limitante	P	gynéco	83	L	T	0,002	(287)	
	classique	R	sein	104	F	T	0,19	(288)	
	classique	P	ORL	25	F	T	0,5	(289)	
	classique	P	ORL	25	F	A	NS	(290)	
	classique	R	sein	79	F	T	0,13	(291)	
	classique	R	sein	22	F	A T	>0,21 >0,034	(292)	
	MTT	R	sein	56	LB	T	<0,02	(293)	
	classique	R	sein	31	F	A fibrose télangiectasies	NS 0,009 NS	(248, 294)	
	classique	R	sein	32	F	A	>0,5	(295)	
	dilution limitante	P	ORL	21	L	T	NS	(247)	
	classique	P	ORL	17	F	T	0,0013	(246)	
	dommages chromosomiques	classique	R	sein	6	F	T	0,02	(296)
G2-MN		P	sein	59	L	A	<0,005	(297)	
G2		P	gynéco	62	L	T	0,002	(258)	
aberrations		R	sein	86	L	T	0,13	(298)	
MN		P	sein	116	L	A peau	NS	(299)	
G2		P		123		A peau	0,004		
MN		R		47		télangiectasies fibrose	0,042 0,055		
MN		R		47		HRS	0,009	(300)	
aberrations		R	sein	16	L	témoins vs			
dommages de l'ADN et réparation		IFI pH2AX	R	divers	12	L	atypique	<0,0001	(301)
		IFI pH2AX	P	ORL	31	Let LB	A	NS	(302)
		IFI pH2AX	P	gynéco	29	L	T	0,59	(303)
		IFI pH2AX	R	prostate	40	L	T	NS	(304)
	comètes	P	ORL	34	L	A	0,039	(305)	

	ECP	P	sein	29	L	T	<0,031	(306)
	comètes	R	sein	59	L	T	NS	(297)
	ECP	P	sein	108	L	A	0,50	(307)
	comètes	P	sein	50		T	0,66	
	comètes	P	sein	113	L	A	NS	(308)
	ECP	R	sein	49	F	T	0,48	(309)
	comètes	P	sein	30	F & L	A	<0,05 (L)	(310)
							NS (F)	
	ECC	R	sein	12	F	T	NS	(311)
	comètes	R	sein	28	L	A & T	<0,02	(312)
	ECP	P	sein	39	F	T	<0,003	(313)
apoptose lymphocytaire	CF-annexine	P	gynéco	94	L	grèle rectale urinaire	0,002 0,02 0,003	(314)
	CF-annexine	P	sein	26	L	T	0,008	(315)
	CF-annexine	P	ORL	79	L	xérostomie	0,035	(316)
	CF-annexine	R	prostate	45	L	T	0,01	(279)
	CF-IP	R	divers	60	L	T	NS	(317)
	CF tunnel	R	sein	31	L	T	NS	(318)
	CF-IP	R	sains HRS	12	L	A & T	<0,01	(319)

Tableau 12 : Résultats publiés des principaux tests prédictifs de radiosensibilité individuelle.

Abréviations : P: prospectif; R: rétrospectif; F: fibroblastes; L: lymphocytes; LB: lymphoblastes; A: aigu; T: tardif; NS: non significatif; MTT: bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltréazolium; MN: micronoyaux; G2: test en phase G2; ECC: électrophorèse en champ constant; ECP: électrophorèse en champ pulsé; CF: cytométrie en flux; IP: iodure de propidium.

Il n'existe actuellement aucune technique standard recommandée en pratique quotidienne. La rapidité d'une méthode n'est pas une preuve de fiabilité ni de prédictibilité : les différences interindividuelles et inter tissulaires ainsi que les tests moléculaires rapides peuvent recéler des pièges. De plus, l'usage des lymphocytes peut entraîner des biais dans la prédiction des réactions radio induites des tissus conjonctifs.

Ces tests doivent implicitement se référer à la survie clonogénique qui reste la méthode de référence historique pour quantifier la radiosensibilité cellulaire in vitro.

4.5.7. Courants actuels

Notre démarche se pose en parallèle de celle du consortium européen GENEPI soutenu par l'ESTRO (Allemagne, Pays-Bas, Belgique, Pologne + Canada) qui a établi une banque de tissus contenant des fibroblastes de la peau, du sang total, du plasma, des lymphocytes et des lignées cellulaires lymphoblastiques chez des patients ayant présenté une toxicité inhabituelle telle que définie précédemment.

Onze patients ont été identifiés avec un âge moyen de $61,6 \pm 8,5$ ans (extrêmes 49-74); 2 hommes et 9 femmes. Un patient a été traité pour un cancer bronchique non à petites cellules, 6 pour un cancer du sein, 2 pour un cancer des VADS, 1 pour un lymphome et 1 pour un méningiome. Le délai moyen de suivi après la RT était 1658 ± 1048 jours (extrêmes: 84-3752) (320). Les toxicités observées ont été aussi bien précoces que tardives : épidermite aigue, fibrose, atrophie cutanée, pneumopathie radique, neuropathie optiques ayant conduit à la cécité... Nous sommes dans l'attente des résultats des profils géniques dans les divers tissus prélevés chez les patients.

Mentionnons également les consortia internationaux visant à construire des modèles statistiques prédictifs en vue d'adapter les modalités de la RT eu égard aux données de tests génomiques de radiosensibilité (ex : projet FP7 REQUITE) (321).

A côté de la connaissance a priori de la radiosensibilité individuelle, nous venons de souligner l'importance de la réduction du volume de tissus sains irradié à forte et à faible dose. Les techniques avancées de photon thérapie permettent d'améliorer ce premier point mais conduisent généralement à une augmentation du volume tissulaire irradié à dose moyenne à faible pour des raisons physiques.

5. L'hadronthérapie : une solution technique plus efficace et moins toxique ?

5.1. Révolution technologique de la RT conventionnelle

La RT a vécu une véritable révolution technologique, les progrès observés permettant à la fois d'augmenter le taux de guérison et d'améliorer la tolérance. Elle bénéficie de trois axes d'optimisation technique dont la résultante est un bénéfice clinique effectif :

- 1- meilleure définition de la cible tumorale grâce aux moyens d'imagerie numérisée,
- 2- optimisation de la distribution de la dose délivrée au volume à irradier, par l'utilisation de nouvelles modalités de délivrance (modulation d'intensité, RT stéréotaxique) ou par la diffusion de modalités spécifiques (curiethérapie, proton thérapie).
- 3- prise en compte des variations anatomiques en cours d'irradiation par les techniques de RT guidée par l'image et la synchronisation respiratoire, demain l'adaptation aux variations de volume pendant l'irradiation

5.1.1. Une meilleure définition des volumes

Le premier progrès dont a bénéficié la RT depuis vingt ans a concerné l'acquisition des données anatomiques, qui, désormais, repose sur la scanographie complétée des informations cliniques, et d'autres méthodes d'imagerie anatomique ou fonctionnelle : Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), Tomographie par

Emission de Positons (TEP). Plusieurs modalités d'imagerie peuvent être fusionnées. Ces progrès de l'imagerie ont permis une plus grande précision dans la définition des volumes, donc une irradiation plus efficace et mieux tolérée.

5.1.2. Une meilleure distribution de la dose délivrée

Dans les 50 à 60 premières années de la RT, les concepts de base en imagerie, radiobiologie et dosimétrie physique firent l'objet d'études approfondies de sorte que vers le milieu du 20^e siècle la place de la RT dans l'arsenal thérapeutique oncologique était acquise, du moins pour les tumeurs situées à moins de 5 cm de profondeur. Les traitements étaient planifiés manuellement dans deux dimensions eu égard à la connaissance des performances balistiques des faisceaux utilisés. Les hautes énergies de rayonnement firent leur apparition avec les télé cobalts puis la première génération d'accélérateurs linéaires ouvrant l'accès aux lésions profondes.

En 1972 la tomodensitométrie fut commercialisée, ouvrant l'ère moderne de la RT conformationnelle. Bien que l'imagerie métabolique (tomographie par émission de positrons [TEP], tomographie d'émission mono photonique [SPECT]) se développa dans les années 1960, elle ne s'incorpora dans la planification de la RT que dans les années 1970, apportant son lot de données fonctionnelles seulement récemment mises à profit pour le contournage des volumes cibles.

La dosimétrie 3D n'est passée en routine qu'avec la miniaturisation et l'extraordinaire ascension de la puissance de calcul des ordinateurs à partir des années 1980 pour planifier le traitement en temps réel et optimiser le nombre, la forme et l'orientation des faisceaux. Avec les techniques de RT conformationnelle, une combinaison de champs d'irradiation s'adapte au volume cible. A l'intérieur de chaque champ, l'intensité de la dose est homogène. Avec la planification inverse, le radiothérapeute contourne le volume cible et les organes à risque et leur assigne des limites de doses. La représentation tridimensionnelle de l'intensité de dose devient délibérément inhomogène. Le principe de la RT conformationnelle est ici amélioré en modulant en cours de séance le débit de dose délivré par chacun des faisceaux. Cette modulation

est assurée par un collimateur multi lames, dont les lames sont mises en mouvement au cours de la séance de traitement.

Dès 2000, les systèmes de planification et d'irradiation dédiés à l'Irradiation avec modulation d'intensité (RCMI ou IMRT) devenaient disponibles en routine. En parallèle, un contrôle qualité spécifique devait s'imposer. Fin 2006, la Haute Autorité de santé (HAS) a rendu un avis sur les indications concernées par la RCMI.

Plus avancée encore, l'arc thérapie volumétrique modulée (VMAT) utilise la combinaison simultanée pendant l'irradiation :

- d'un mouvement continu des lames du collimateur,
- d'une variation du débit de dose,
- d'une variation de la vitesse de rotation du bras de l'accélérateur

Récemment des appareils totalement dédiés à ces techniques ont fait leur apparition et ont vocation à se généraliser.

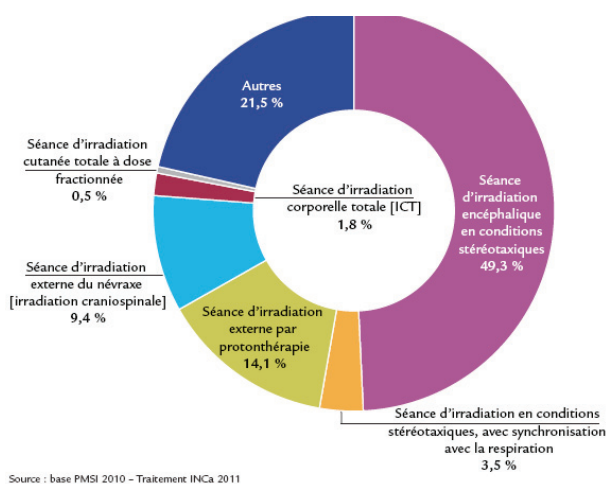


Figure 20 : Répartition des actes de RT innovante en France en 2010 (source INCa)

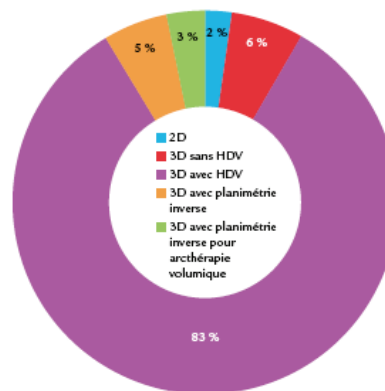


Figure 19 : Répartition des traitements selon le type de dosimétrie en France, en 2010 (source INCa)

Parallèlement à cette démarche d'optimisation des traitements de moyen et grand volume, des techniques ultra précises ont été développées dès les années 1970-80 : la RT en conditions stéréotaxiques fondée sur la technique éponyme de neurochirurgie. Elle vise à exposer avec une haute résolution une lésion de volume restreint à une dose élevée de photons en une (radio chirurgie "ablative") ou plusieurs fractions au moyen de microfaisceaux permettant une décroissance de dose très rapide en dehors du volume cible. La petite taille de la cible impose un

positionnement d'une rigueur extrême (repositionnement infra millimétrique ou millimétrique). Les principales technologies de stéréotaxie sont le Gamma Knife™ (ensemble de 201 sources fixes de Cobalt 60), l'accélérateur linéaire spécialement équipé (par ajout d'un micro collimateur) ou complètement dédié (Cyberknife™, Novalis™...). Ils se distinguent les uns des autres par leur source de rayonnement (photons de haute énergie, rayonnement gamma), le nombre de faisceaux utilisés et leur mobilité par rapport au malade. L'évolution des techniques d'imagerie et de reconnaissance d'image en temps réel permet aujourd'hui d'utiliser la RT en conditions stéréotaxiques en dehors du seul volume crânien et même de suivre en temps réel les mouvements de la cible (tracking).

Dans le but d'adapter, de conformer, au mieux l'irradiation au volume cible, l'idée d'introduire des sources radioactives directement dans les tumeurs ou à leur contact est très ancienne. La curiethérapie, née de la découverte du Radium, a très tôt apporté des résultats cliniques spectaculaires. De nombreuses applications se sont développées avec les isotopes artificiels : césium 137 puis iridium 192 dans des contextes techniques mondialement reconnus comme les systèmes dosimétriques de Paris et de Manchester.

La curiethérapie s'est littéralement métamorphosée ces dernières années pour devenir conformationnelle guidée par l'image et beaucoup plus sûr sur le plan de la radioprotection des personnels soignants grâce à la généralisation des projecteurs de sources miniaturisées.

L'imagerie tridimensionnelle par scanner, IRM ou échographie endorectale est actuellement utilisée comme support pour le calcul de la répartition de la dose, avec des logiciels tout à fait semblables à ceux de la RT externe permettant un calcul immédiat de la distribution de dose et son évaluation par des histogrammes dose volumes (HDV) pour les volumes cibles et les organes sensibles.

Malgré la dissémination (Figures 19 & 20) des progrès techniques constants de la RT "conventionnelle" par photons de haute énergie, sa plus grande précision et sa meilleure fiabilité, ses limites sont toujours de la même nature : la faible efficacité sur les tumeurs radio résistantes et l'irradiation de grands volumes de tissus sains. Ceci tient essentiellement à la physique des faisceaux de photons. Signalons enfin la faible efficacité biologique des

photons qui entraînent des dommages cellulaires réparables dans la majorité des cas. La place relative des diverses techniques de RT est illustrée dans les tableaux 13 & 14.

5.1.3. Les volumes de tissus sains irradiés

Toutes ces techniques de haute conformation ne peuvent se concevoir sans une immobilisation adaptée du patient et un contrôle du positionnement avant/pendant les séances de RT afin de réduire les incertitudes de positionnement et donc les marges de sécurité à prévoir qui sont autant de volume de tissus sains à irradié. Ces concepts seront abordés plus en détail dans la livrable ULICE - JRA2.5.

Des progrès substantiels ont été réalisés dans ce domaine mais le problème principal reste toujours l'importance des volumes de tissus sains irradié du fait de la balistique propre aux photons qui les fait traverser la totalité du patient pour chaque incidence d'irradiation.

L'IMRT a de ce point de vue-là apporté une modification substantielle dans la répartition des doses « indues » aux tissus sains. En utilisant davantage de faisceaux, modulés qui plus est, l'irradiation est davantage conformée aux volumes cibles mais la dose intégrale rapportée au corps entier augmente en parallèle des radiations indésirables produites. Cet effet est proportionnel au volume tumoral à traiter. Ces faibles doses se distribuant dans un large volume de tissus sains font le lit de la carcinogénèse radio induite (63).

5.1.4. Un sur risque carcinogène ?

Il a été mentionné un hypothétique sur risque carcinogène radio induit résultant de l'utilisation de ces nouvelles techniques avec davantage de faibles doses délivrées en dehors du volume cible. Des données préliminaires suggèrent que la réalisation quotidienne d'une imagerie de type CBCT pourrait augmenter le risque de second cancer (322).

L'utilisation de la RCMI augmente le volume irradié à doses faibles et intermédiaires. De plus, c'est l'irradiation de fuite au niveau de la tête qui prédomine à distance des volumes cibles. Par conséquent, la dose « faible » distribuée avec la RCMI augmente, puisque le nombre d'unités moniteurs (UM) nécessaires au traitement pour délivrer la dose attendue à la tumeur est plus élevé, d'un rapport 3 à 4, comparativement à la RT conformationnelle 3D. Le choix de l'énergie des photons utilisés est également un facteur d'irradiation en dehors des volumes de traitement, car les fortes énergies sont un facteur de production de neutrons secondaires (323). Au total, le risque de seconds cancers semble doublé avec l'utilisation de la RCMI, avec un risque par organe allant de 1,2 à 2,4 (324).

Plusieurs auteurs ont calculé les doses délivrées en dehors des champs de traitement par la tomothérapie hélicoïdale, et montré qu'elle était supérieure à celle délivrée par des traitements conventionnels (325). La probabilité de décéder d'un second cancer après une irradiation à la dose de 70Gy, fut estimée à 2,5 % pour une tomothérapie hélicoïdale avec photons de 6MV, soit plus du double du risque d'une RCMI avec photons de 6MV (326). Avec la RT stéréotaxique robotisée, le nombre d'inclinaisons de bras nécessaire au traitement peut être considérable et donc augmente le volume de tissus sains recevant des faibles doses, tout comme un rayonnement de fuite, initialement non négligeable, de la tête de l'appareil. Le volume concerné par les faibles doses pouvait être deux à cinq fois supérieur à celui d'un traitement en Gammaknife[®], et environ quatre fois supérieur à celui d'une RCMI (327).

Bien que ces considérations soient de peu d'intérêt face à la gravité et aux limites carcinologiques persistantes des traitements actuels, qui de plus concernent essentiellement des patients qui ont plus de 50 ans, il est indéniable que ce risque serait au contraire utile à prendre en compte pour les plus jeunes patients : les enfants et les jeunes adultes. La solution est encore une fois la limitation drastique des volumes de tissus sains irradiés.

5.1.5. Place des techniques innovantes dans l'arsenal radiothérapeutique

Technique	particule	moyen	avantages	limites	rationnel
Modulation d'intensité (RCMI, arc thérapie dynamique, tomothérapie)	Photons	Modulation en cours de séance du débit de dose délivré par chaque faisceau. Progrès des accélérateurs linéaires classiques, accélérateurs dédiés, collimateurs multilames, irradiation dynamique, couplage à l'imagerie de repositionnement parfois très précise (tomothérapie), asservissement possible aux organes en mouvement (gating)	Conformation optimisée, meilleure couverture	Multiplicité des portes d'entrée, majoration du volume irradié à faible dose, temps d'irradiation pour la tomothérapie, jonctions de champs pour les grands volumes (sauf tomothérapie et arc thérapie)	Volume cible de forme complexe, entourant partiellement un organe à risque.
Radio chirurgie (accélérateur classique, Cyberknife™, Novalis™, Gamma Knife™)	Photons	Accélérateur miniaturisé et robotisé, microfaisceaux, multiplicité des portes d'entrée, tracking, hypofractionnement, couplage à l'imagerie de repositionnement en temps réel	Précision, sur efficacité biologique sur la tumeur liée à l'hypofractionnement corrélée à une diminution du nombre de séances	Petits volumes, temps d'irradiation, site endocrânien pour gamma-knife et stéréotaxie classique, invasivité des fiduciaires et du cadre de stéréotaxie	Malformations vasculaires, tumeurs bénignes ou malignes de petite taille et très proches de structures fonctionnelles très sensibles ou englobant une structure saine
Curiesthétique	Photons émis par désintégration de radioéléments (césium 137, l'Iridium 192, Iode 125)	Implantation interstitielle ou endocavitaire, permanente ou temporaire, projecteur de source (PDR), couplage à l'imagerie 3D, débit de dose modulable	Irradiation quasi exclusive, homogène et conformationnelle de la tumeur, radiobiologie optimale pour le bas débit, volume couvert par les faibles doses négligeable, précision inégale, 4D par essence	Radioprotection des patients - soignants - proches, invasivité, opérateur-dépendance	Irradiation à dose élevée sur un volume limité, dans un organe accessible, dont la position est peu reproductible et pour lequel la conservation anatomique et fonctionnelle est capitale
Proton thérapie	Protons (pic de Bragg)	Particule + lourde, accélérateur circulaire, technologie de balayage actif, bras iso centrique, couplage à l'imagerie de repositionnement	Précision balistique, profondeur de prescription modulable, faible volume irradié à faible dose, excellente tolérance	Accessibilité, coût d'une séance	Tumeurs nécessitant une forte dose, situées à proximité d'organes à risque sensibles. Nécessité d'épargne maximale des tissus sains
Carbone thérapie	Ions carbone (pic de Bragg)	Particule +++ lourde, accélérateur circulaire, technologie de balayage actif, couplage à l'imagerie de repositionnement y compris fonctionnelle	Précision balistique, profondeur de prescription modulable, sur efficacité biologique liée à l'hypofractionnement et au TEL des particules, faible volume irradié à faible dose, pas de limitation de volume, excellente tolérance	Accessibilité, coût d'une séance	Cancers localisés non opérables (ou en résection incomplète), « radio résistants » et situés à proximité d'organes à risque sensibles

Tableau 13 : Synthèse des indications validées et potentielles d'hadronthérapie (ions carbone, protons, neutrons) et de techniques innovantes en photon thérapie (RT stéréotaxique ; RCMI) ayant fait l'objet d'une évaluation institutionnelle en France (HAS ; ANAES ; CCAM ; INCa)

Localisation / histologie	Indications : libellé HAS (ou CCAM ou CSR)	Ions carbone	RTS	RCMI	Protons	Neutrons
Tête et cou	Carcinomes adénoïdes kystiques de la tête et du cou	C1				X ^a
	Indications de la tête et du cou toutes localisations confondues	C2			P3	
	Tumeurs de la tête et du cou, dans le cas où une protection des glandes salivaires est souhaitable			A*		
Glandes salivaires	Tumeurs des glandes salivaires en absence de résection complète	C1				X
Base du crâne & crâne ; système nerveux central	Chordomes et chondrosarcomes de la base du crâne	C1 C2			X-P1	
	Tumeurs de la base du crâne et de la voûte			A*		
	Ventricules cérébraux chez l'enfant, craniopharyngiome, tumeurs hypophysaires (gliomes de haut grade exclus)			A*		
	Méningiomes				P2	
	Schwannomes vestibulaires				P2	
	Tumeurs du SNC				P2	
	Irradiation crânio-spinale			B [§]		
Oeil	Tumeurs primitives de l'œil				X-P1	
Rachis	Tumeurs du rachis		A	A*		
	Chordomes et chondrosarcomes du rachis				X-P1	
Sarcomes	Sarcomes des tissus mous et du squelette axial	C2				
	Sarcomes inopérables de bas grade				P2	X
	Tumeurs des membres			B		
Poumon	Tumeurs des poumons			B [§]		
	Tumeurs pulmonaires non à petites cellules	C1 C2				
	Tumeurs broncho-pulmonaires primitives T1T2N0M0		A		P3	
	Métastase broncho-pulmonaire à croissance lente avec tumeur primitive contrôlée		A			
Foie	Hépatocarcinomes de grande taille	C3				
	Tumeurs hépatiques		B [§]		P3	
Rétropéritoine	Tumeurs rétropéritonéales			B		
Autres tumeurs digestives	Cancer gastro-intestinal				P2	
	Tumeurs de l'œsophage				P3	
	Cancer du pancréas				P3	
Pelvis	Tumeurs de la prostate	C3		A [§]	P2	
	Tumeurs du col de l'utérus	C3			P2	
	Rechutes locales non résécables des tumeurs du rectum	C3				
Pédiatrie	Tumeurs en pédiatrie			B	X-P2	
ICT/IMT	Irradiation Corporelle Totale			A [†]		
	Irradiation Médullaire Totale			B [†]		
Traitement symptomatique	Traitement symptomatique antalgique décompressif		B			
	Métastases osseuses multiples			B [†]		

Tableau 14 : Synthèse des indications des principales techniques avancées de RT ayant fait l'objet d'évaluation institutionnelles

CSR : Comité de Suivi de la RT

RTS : RT extra crânienne en conditions stéréotaxiques (rapport HAS – décembre 2006)

RCMI : RT Conformationnelle avec Modulation d'Intensité, incluant la tomothérapie

X : indication limitative faisant l'objet d'un acte de la CCAM

[§] Sous réserve du respect de procédure de contrôle de positionnement

[†] Tomothérapie uniquement

^a Quelle que soit la localisation

L'hadronthérapie par ions carbone a fait l'objet d'un rapport préliminaire de l'HAS (Février 2010). Les indications sont classées comme suit :

C1 : « potentiellement plus performante que la RT conventionnelle »

C2 : « potentiellement équivalente à d'autres techniques de RT de très haute technicité »

C3 : « le bénéfice ne serait pas défini »

A : « service attendu suffisant »
B : « service attendu non déterminé »

La **proton thérapie** et la **neutron thérapie** ont fait l'objet d'une évaluation en 2004 par l'**ANAES**.
Les indications de la **proton thérapie** ont été également évoquées dans le **3^e rapport d'étape du comité national de suivi de la RT**, et classées comme suit :

P1 : « indications validées »

P2 : « indications en cours d'évaluation »

P3 : « indications potentielles qui pourraient faire l'objet d'une évaluation approfondie »

Le libellé des indications dans le tableau est soit celui de la CCAM (X) ou celui du rapport d'étape du comité de suivi de la RT.

Indications limitatives faisant l'objet d'un acte de la CCAM pour la RCMI :

Tumeur de la tête et du cou lorsqu'une protection des glandes salivaires est nécessaire ;

tumeur de la prostate ;

tumeur du rachis ;

tumeur de la base du crâne et de la voute, à l'exclusion des gliomes de haut grade ;

irradiation corporelle totale

Indications limitatives faisant l'objet d'un acte de la CCAM pour la RT stéréotaxique :

méningiome, gliome, neurinome du nerf vestibulocochléaire [acoustique] [VIII], métastase cérébrale (de 1 à 3) ; malformation artérioveineuse ; tumeur spinale ou para spinale

tumeur broncho-pulmonaire T1/T2 N0 M0 ; métastase broncho-pulmonaire à croissance lente avec tumeur primitive contrôlée

5.2. L'hadronthérapie

L'amélioration de la précision balistique de la RT au fil des décennies grâce au développement technologique constitue la pierre angulaire du succès de la RT moderne. Mais dans 5 à 10% des indications toutefois, le radiothérapeute se heurte à des tumeurs malignes ou bénignes intrinsèquement radio résistantes et/ou placées au sein d'organes à risque radiosensibles que les radiations ionisantes conventionnelles ne parviennent à contrôler. A cet égard, les propriétés radiobiologiques particulières de certains « hadrons » permettent, outre l'intérêt balistique, d'évoquer l'utilité de l'hadronthérapie pour traiter plus efficacement les tumeurs radio résistantes grâce à leur EBR - efficacité biologique relative [aux photons] - plus grande. L'intérêt médical des ions accélérés fut soulevé dans les années 40 par Wilson (328).

Plusieurs modalités d'hadronthérapie existent.

- **Les neutrons rapides** sont des particules neutres, indirectement ionisantes par les protons de recul mis en mouvement dans la matière. Les faisceaux de neutrons rapides possèdent le même rendement en profondeur que les photons de haute énergie mais avec une EBR supérieure, tout au long de leur trajectoire. Les effets tardifs observés dans les années 1970-80 étaient plus fréquents et sévères qu'attendu (329, 330); peu d'essais cliniques comparatifs ont été produits, ceux

réalisés pour les gliomes malins n'ont pas été favorables notamment du fait de cette toxicité (331). Les 8 centres encore en activité dans le Monde (40 précédemment dont un en France) traitent dans des essais des tumeurs superficielles radio résistantes localement avancées en place: tumeurs de la tête et du cou, des glandes salivaires et des sinus, sarcomes, cancers prostatiques, mésothéliomes, cancers du sein... avec une balistique ayant profité des avancées technologiques de la photon thérapie (techniques rotationnelles, modulation d'intensité). Environ 30 000 patients ont été traités à ce jour. Nous ne l'aborderons plus par la suite.

- Certaines "**particules exotiques**" ont peu fait l'objet d'études auxquelles le lecteur pourra se rapporter : pions (mésons π^-) (332) et antiprotons (333). Nous ne les aborderons plus par la suite.

- **Les protons** possèdent les mêmes propriétés biologiques que les rayons X, mais sont beaucoup plus précis du fait de leur charge qui limite leur trajectoire en profondeur qui se termine par un pic de Bragg. Plus de 120 000 patients ont été traités dans le monde par proton thérapie depuis les années 1960. Cette modalité continue à connaître un essor important servi par une offre industrielle qui se développe vers la miniaturisation des installations.

- **L'hadronthérapie par ions carbone** ($^{12}\text{C}^{6+}$) est de développement plus récent et présente un double avantage par rapport aux rayons X. Outre leur balistique d'une précision comparable à celle des protons, les ions $^{12}\text{C}^{6+}$ peuvent délivrer une dose dont l'EBR peut atteindre voire dépasser un facteur 3 quasi exclusivement dans la tumeur. Depuis 1994, plus de 13 000 patients ont bénéficié d'une carbone thérapie, essentiellement au Japon et les indications thérapeutiques sont en cours de validation en Europe. Les centres européens opérationnels ou à venir mettent en place des collaborations de recherche appliquée et clinique auxquels la France participe activement (Figure 21).

Aux USA, 2487 patients ont été traités par hadronthérapie en Californie au *Lawrence Berkeley National Laboratory* à partir de 1957 par ions d'hélium (^4He), puis à partir de 1975 au BEVALAC jusqu'en 1992 par différents ions plus lourds : carbone (^{12}C), néon (^{20}Ne), silicium (^{28}Si) et argon (^{40}Ar), seul un petit nombre de patients ont été traités par carbone thérapie.

Abandonnée en 1993 pour des raisons économiques, l'expérience américaine reste essentielle pour l'extraordinaire créativité technique et technologique dont elle a fait

preuve et l'évaluation de la toxicité à long terme et notamment des risques de cancers secondaires qui se sont révélés totalement négligeables (334).

Au Japon à partir de 1994 se développe l'expérience contemporaine des ions carbone avec plus de 10000 patients traités : exploration de nombreuses indications grâce aux possibilités du contrôle passif du faisceau, un peu moins avantageux sur le plan dosimétrique mais moins coûteux, beaucoup plus souple et universel d'utilisation y compris pour des tumeurs mobiles (foie, poumon, pancréas), utilisation des possibilités de l'hypofractionnement ce qui représente un grand avantage économique, étude et description de nombreux protocoles qui constituent des références et une base opérationnelle pour tous les centres du monde.

En Europe, la première concrétisation apparaît en Allemagne en 1998 avec les premiers traitements par ions carbone à Darmstadt (centre de recherche nucléaire GSI) de 1998 à février 2008 puis à Heidelberg (Centre HIT au CHU de Heidelberg) depuis novembre 2009. Les conditions de réalisations sont alors plus limitantes que celles du Japon (faisceaux horizontaux fixes, balayage actif mais débit faible). Pour cette raison, l'expérience européenne initiale n'a concerné que des tumeurs non mobiles de la tête et du cou. L'ouverture du CNAO à Pavie en Italie en septembre 2011 a élargi notablement l'offre de soins en Europe. Il traite en carbone depuis novembre 2012 en contrôle actif avec des faisceaux horizontaux et verticaux ; enfin plus récemment HIT a mis en service en octobre 2012 le premier faisceau carbone rotatif iso centrique du Monde ce qui permettra des irradiations dans toutes les régions du corps en Europe comme cela se fait déjà au Japon depuis plusieurs années avec des faisceaux fixes de diverses inclinaisons.

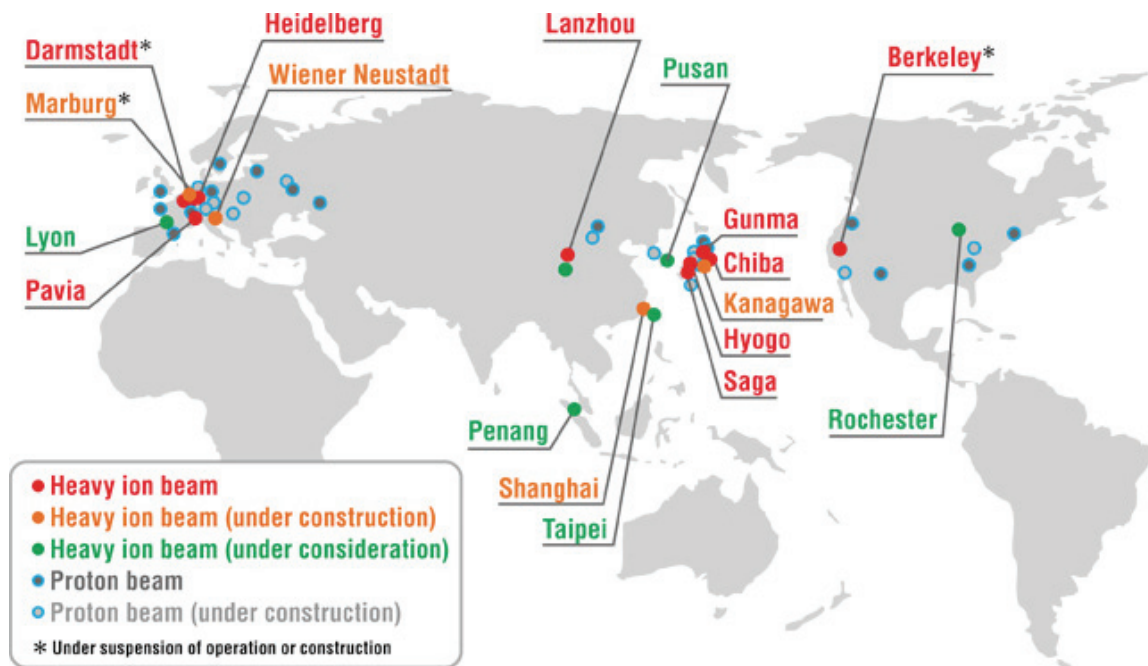


Figure 21 : Principaux centres d'hadronthérapie dans le monde en 2014

L'hadronthérapie représente une thérapie innovante puisqu'elle offre des possibilités physiques et biologiques non atteintes jusque-là en RT externe. Les distributions de dose obtenues avec des particules chargées sont incontestablement supérieures à celles réalisables avec des photons permettant une épargne tissulaire quasi optimale.

5.2.1. Technologie mise en œuvre

La production et la délivrance d'un faisceau de « hadrons » requiert des infrastructures qui expliquent le coût relativement élevé de ces traitements (à pondérer par un nombre de fractions restreint) (335).

Source et accélérateur de particule

Les particules sont produites à partir d'un plasma en utilisant de l'hydrogène ou du dioxyde de carbone puis injectées sous vide dans un accélérateur circulaire.

Parmi les « accélérateurs circulaires » on distingue les cyclotrons, les synchrotrons et le synchrocyclotrons qui diffèrent par la gamme énergétique et le rendement produits.

Dispositifs de pilotage du faisceau de traitement

Le faisceau est transporté après l'extraction de l'accélérateur vers différentes salles, toujours sous vide. Des systèmes électriques (déviateurs) et magnétiques servent à modifier la trajectoire (dipôles) et à focaliser le faisceau à la façon de lentilles optiques (quadrupôles). Au niveau du volume cible, le faisceau peut être sculpté dans les trois dimensions de l'espace à l'aide de dispositifs passifs (absorbeurs, modulateurs, collimateurs, compensateurs) interposés avant d'arriver au patient. Les centres européens de carbonothérapie et quelques centres de protonthérapie utilisent dans le même objectif un système de balayage du faisceau natif sortant de l'accélérateur. Le balayage d'un petit faisceau en position, en énergie et en intensité modulables permet de réguler la distribution de dose sans utiliser de composant interposé sur la ligne de faisceau, générant ainsi moins de neutrons indésirables.

Les bras isocentriques (gantry) permettent l'irradiation d'un patient avec des incidences multiples du faisceau sans qu'il soit nécessaire de déplacer le patient pour différentes incidences d'irradiation. Leur développement est cependant beaucoup plus complexe et onéreux avec les ions plus lourds, une seule gantry carbone est installée à ce jour au centre HIT.

5.2.2. Propriétés physiques des hadrons

Les hadrons sont des particules subatomiques constituées de quarks, plus petites particules connues entrant dans la composition de la matière. Ils sont sensibles à l'interaction forte qui assure la cohésion du noyau atomique. Selon le nombre de quarks entrant dans leur composition, les hadrons sont dénommés baryons (3 quarks, ex: protons, antiprotons, neutrons) ou mésons (1 quark + 1 antiquark, ex : méson π).

Les ions légers (carbone, hélium, oxygène...), sont des noyaux atomiques dépourvus de leur nuage électronique, et sont donc des assemblages d'hadrons.

Les médecins considèrent comme « lourds » les noyaux de numéro atomique supérieur à 10 (Néon), le carbone a un n° atomique de 6.

L'hadronthérapie utilise ainsi toutes sortes d'hadrons « vrais » et composites (ions) répertoriés dans le Tableau 15.

Radiations	Groupe	Masse (MeV)	Charge
photons	bosons	0	0
électrons	leptons	0,51	-1
neutrons	baryons	939,6	0
pions négatifs	mésons	139,6	-1
protons	baryons	938,2	+1
ions He	baryons (ions légers)	3755,6	+2
ions Li à Ne	baryons (ions légers)	m _{Li à Ne} (11.185 pour C)	+3 à +10
ions Na à Ar	baryons (ions lourds)	m _{Na à Ar}	+11 à +18

Tableau 15 : Principales radiations utilisées en RT et leurs caractéristiques physiques

Les « hadrons » (vrais et composites) ont une masse de 2 000 à plus de 20 000 fois supérieure à celle de l'électron et éventuellement une charge dont vont découler leurs propriétés physiques et radiobiologiques. Du fait de leur charge, les

« hadrons » (sauf les neutrons) sont sensibles à l'interaction électromagnétique et leur trajectoire peut être déviée par un champ magnétique.

Leur trajectoire est caractérisée par un cœur linéaire présentant une forte densité d'ionisations dont émanent latéralement des électrons δ ayant un parcours radiaire de plusieurs microns (voir Figure 22). Cette densité d'ionisation va croître jusqu'à un maximum matérialisé par le pic de Bragg en fin de trajectoire juste avant l'arrêt de la particule.

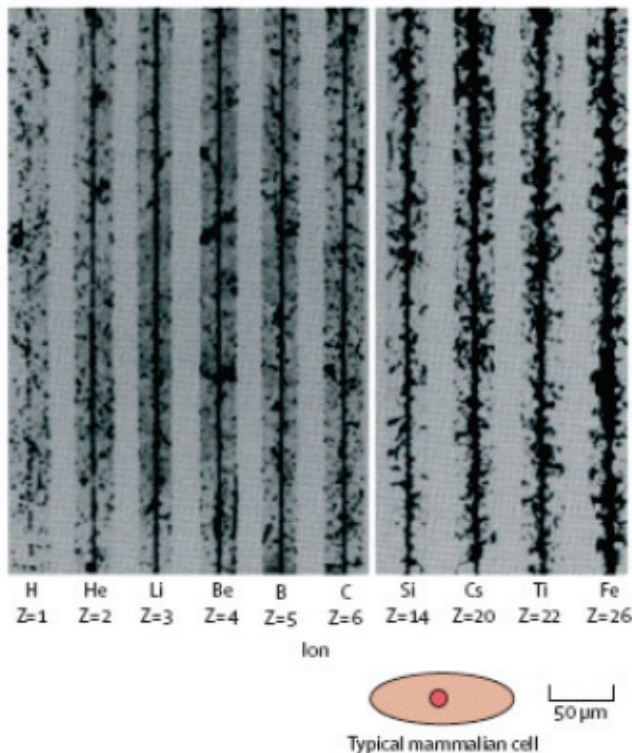


Figure 22 : Trace des principaux hadrons (source : (2))

D'après des données micro dosimétriques et des simulations Monte Carlo, les ionisations et excitations produites par les photons, électrons et protons de haute énergie sont espacées et diffuses dans la matière. Leur transfert d'énergie linéique (TEL) défini comme la perte

d'énergie par unité de longueur est donc faible (inférieur à 10 keV/μm). Par opposition, les ions légers sont des particules plus lourdes. Ils donnent lieu à des ionisations et excitations très proches les unes des autres, par des interactions distinctes. Leur TEL est élevé et peut dépasser 200 keV/μm (voir Tableau 16). On en rapproche les protons de faible énergie, notamment ceux mis en mouvement par les neutrons rapides en neutron thérapie.

Types de radiations	TEL (keV/μm)
<u>Photons</u>	
γ du ⁶⁰ Co (1,25 MeV)	0,3
X de 200 keV	2,5
<u>Electrons</u>	
1 MeV	0,2
100 keV	0,5
10 keV	2
1 keV	10
<u>Particules chargées</u>	
protons de 2 MeV	17
protons de 10 MeV	4,7
protons de 50 MeV	1,3
protons de 100 MeV	0,7
particules alpha de 2,5 MeV/n	166
particules alpha de 5 MeV/n	90
carbone de 100 MeV/n	160
carbone de 200 MeV/n	16,2
fer de 1 GeV/n	1000
fer de 2 GeV/n	150
<u>Neutrons</u>	
2,5 MeV	15-80
14 MeV	3-30

Tableau 16 : TEL des principales radiations utilisées en RT

Cette modalité de dépôt d'énergie est à l'origine de la sur efficacité biologique de ces rayonnements. Cet effet est évalué par l'efficacité biologique relative (EBR). **Il s'agit du rapport de la dose d'un rayonnement de référence (rayons X ou rayonnement gamma du ⁶⁰Co) à la dose physique du rayonnement étudié produisant un même effet biologique, toute autre condition étant identique par ailleurs.**

Les modalités d'interactions coulombiennes des "hadrons" chargés leur donnent un profil de diffusion latérale (*multiple scattering*) et de dépôt de dose en profondeur

(*range straggling*) caractéristique. Au début de leur trajet, ces particules sont rapides et le temps d'interaction avec la matière est faible : les ionisations sont peu nombreuses. Mais à chaque ionisation, elles perdent de l'énergie et donc progressivement de la vitesse et le dépôt d'énergie par unité de longueur (TEL) augmente jusqu'à l'arrêt de la particule. Ainsi, la plus grande quantité d'énergie est déposée en fin de parcours (pic de Bragg) juste avant l'arrêt de la particule – ce qui confère la distribution de dose en profondeur caractéristique (Figure 23). Parce que le pic original est trop étroit pour couvrir complètement l'épaisseur de la lésion cible, ce dernier doit être étalé en modulant l'énergie du faisceau de particules qui a la sortie de l'accélérateur est monochromatique. Se faisant, il s'accumule une certaine dose non désirable dans la zone du couloir d'entrée précédant le pic, où se situent les tissus sains. Contrairement aux protons qui ne déposent quasiment pas de dose au delà du pic de Bragg, les ions plus lourds y subissent une fragmentation lors de leur traversée des tissus, générant de fragments plus légers qui peuvent dépasser le pic de Bragg et entraînant un dépôt de dose mesurable (queue de fragmentation, Figure 23) au-delà (336). Cette fragmentation présente un intérêt en ce qu'elle génère des émissions détectables de l'extérieur du patient ; par exemple l'ion ^{11}C qui apparaît après perte d'un neutron est émetteur β^+ d'une demi-vie de 20 minutes suffisante pour être détecté par une caméra TEP utilisée simultanément ou juste après la séance de traitement (337, 338). La vérification de la bonne position du pic de Bragg en profondeur est un enjeu majeur (339).

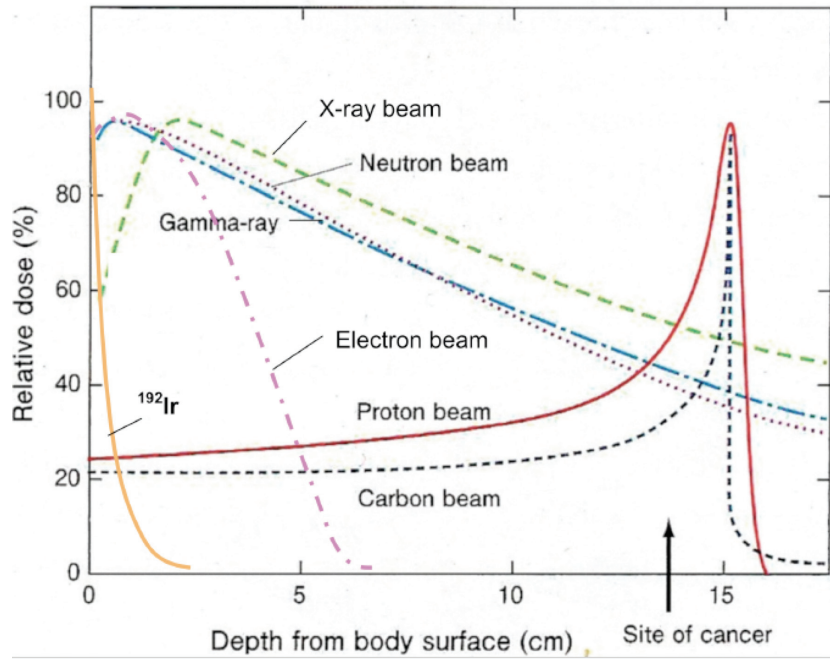


Figure 23 : Courbes de rendement en profondeur des principales radiations utilisées en RT

Plusieurs espèces d'ions légers peuvent en théorie s'avérer efficaces.

Les pionniers de l'hadronthérapie à Berkeley ont comparé :

- les caractéristiques balistiques des différentes espèces (diffusion latérale et variation du TEL en profondeur). Ces valeurs varient de manière inversement proportionnelle à la racine carrée de la masse ce qui favorise apparemment les espèces les plus lourdes (voir Figure 24).

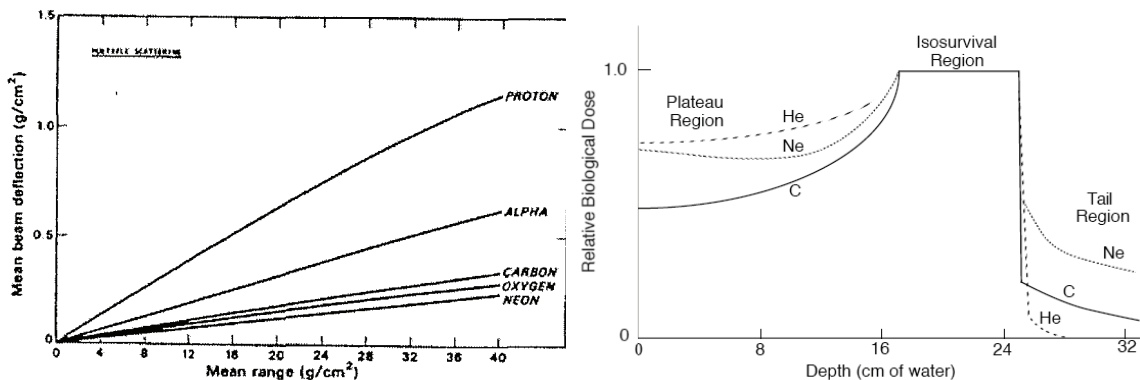


Figure 24 : Courbes de diffusion latérale et variation de l'EBR en profondeur des principales espèces ioniques testées, d'après (340, 341).

- l'efficacité biologique selon le rendement en profondeur. Pour l'application pratique on souhaiterait que la sur efficacité biologique soit minimale dans le couloir d'entrée en amont de la tumeur (*entrance region*) et maximale au niveau du pic de

Bragg étalé (SOBP) au niveau de la tumeur. En aval du SOBP, dans la zone de la queue de fragmentation au-delà de la tumeur, l'EBR doit enfin être minimale. Les études ont conclu que l'espèce ionique optimale se situe entre le lithium et l'oxygène (voir Figure 25).

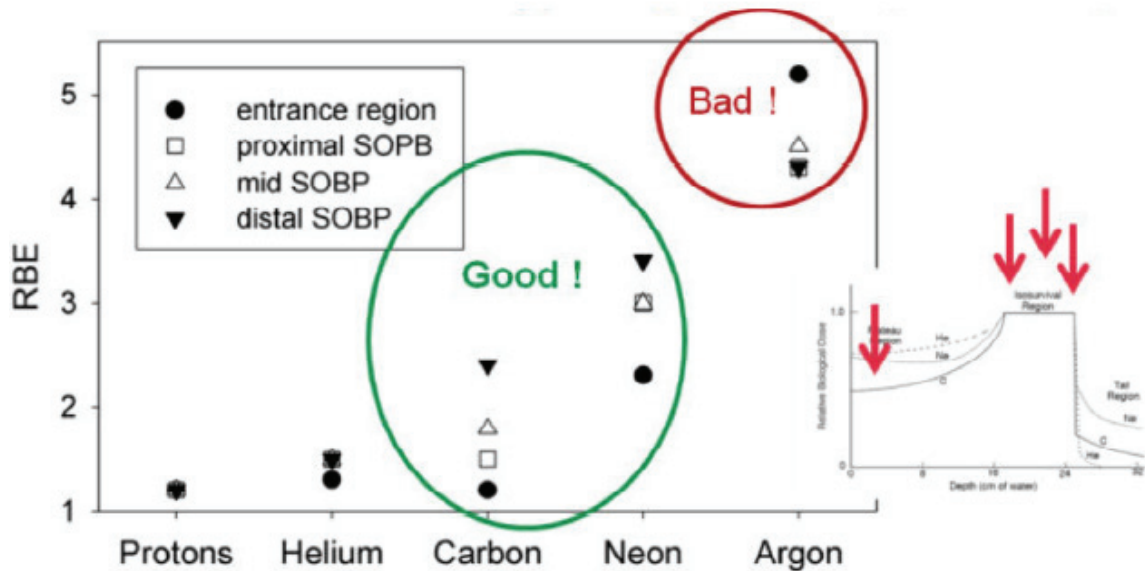


Figure 25 : EBR comparée de 5 particules à différentes profondeurs de leur courbe de rendement en profondeur; (diapositive présentée par O Jäkel, ESTRO 31, Barcelone, 2012; test des cryptes intestinales, SOPB de 8 cm)

5.2.3. Eléments de radiobiologie comparée : quels mécanismes biologiques sont mis en jeu au profit de l'EBR ?

5.2.3.1. Effets moléculaires et cellulaires

Les effets physiques et chimiques des particules chargées sont semblables à ceux que nous avons décrit plus tôt pour les photons mais avec un rendement différent (121). Les micro dépôts d'énergie sont très localisés mais leur distribution peut être très large. Au niveau moléculaire, les radiations de TEL élevé induisent des dommages biologiques différents (Tableau 17).

Radiation	TEL faible	TEL élevé
Traces dans le noyau	1000	4
Ionisations dans le noyau	100 000	100 000
Ionisations dans l'ADN	1500	1500

Dommmages de l'ADN :		
- Dommmages de base	10 000	10 000
- Cassures simple brin	850	450
- Cassures doubles brins	40	40+complexes
- Taille moyenne des fragments de brins	2000 pb	100 pb
Condensations chromosomiques prématurées		
T0	6	12
T8h	<1	4
Aberrations chromosomiques	0,3	2,5
Dont aberrations complexes	10%	45%
Lésions létales	0,5	2,6
Cellules inactivées	30%	85%

Tableau 17 : Rendement biologique moyen dans une cellule de mammifère irradiée à la dose d'1Gy (342).

Les CDB induites par les rayonnements à TEL élevé sont concentrées dans une même région de l'ADN, très proches les unes des autres, ceci est dû à l'organisation de la chromatine en domaines mais surtout à la densité d'ionisations observée le long de la trace (343). Leur distribution est toutefois très large (Figure 26).

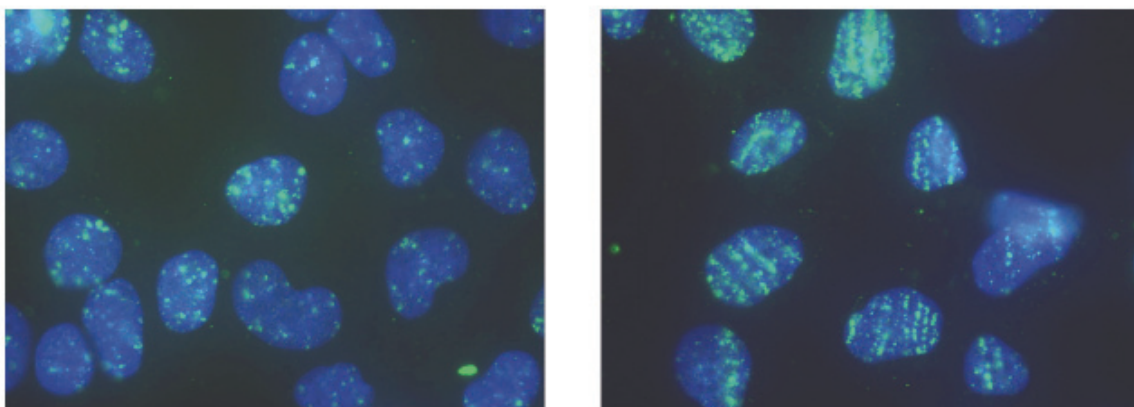


Figure 26 : Immunofluorescence γ H2AX 30 minutes après irradiation de cellules RKO :

- à gauche, une dose de 2 Gy de photons 250 kV (TEL faible)
- à droite, une dose de 0,1 Gy d'ions $^{56}\text{Fe}^{26+}$ 1GeV/n (TEL élevé : 151 keV/ μm)

Nasa Space Radiation Lab, Brookhaven, NY, expérience personnelle, Nasa Space Radiation Summer School 2009

Les CDB produites par les rayons X ou γ sont par contre, distribuées de manière plus éparses et homogènes dans tout l'ADN. Les radiations de TEL élevé induisent des CDB complexes quasi impossibles à réparer avec l'équipement enzymatique (344) et ce, de manière plus lente (345). Chaque type de particule induit un spectre propre de dommages. Les mécanismes de formation, de réparation ainsi que l'impact biologique des CDB diffèrent selon le TEL de la particule (346). Les fragments non

réparés sont plus nombreux après les radiations à TEL élevé qu'après les rayons X (347, 348).

La cinétique de phosphorylation / déphosphorylation de DNA-PKcs est considérablement retardée après irradiation par des particules chargées (349). MRE11 et Ku semblent se lier différemment à l'ADN endommagé (350). La suture en particulier apparaît globalement inhibée (351). Il pourrait s'agir d'un mécanisme de recrutement et d'activation de pATM différent de celui observé après irradiation à TEL faible (352). ATM serait davantage sollicitée dans la signalisation et la réparation de ces CDB plus complexes expliquant une réparation plus lente. Le besoin en protéine pourrait être majoré en présence de lésions plus complexes (345). Les cellules dont l'activité de cette protéine est inhibée présenteraient en effet une radiosensibilité aux particules de TEL élevé plus élevée que lorsque l'activité d'ATM est normale (352). **Le transit du cytoplasme au noyau de la protéine ATM pourrait ne pas être le même suivant l'énergie et la nature de la particule. ATM serait non pas davantage sollicitée mais plutôt moins oxydée dans le cytosol et du coup moins de formes d'ATM monomériques diffuseraient dans le noyau donc les CDB seraient moins reconnues. Nous évoquerons cette hypothèse plus loin.**

Au-delà de la réparation, il existe relativement davantage d'aberrations chromosomiques complexes après irradiation par ions carbone, avec un maximum dans la zone du pic de Bragg (353, 354). Déjà au niveau des territoires chromatiniens interphasiques, le passage d'une trace ionique peut conduire à de multiples cassures d'un même chromosome et donc à de multiples réarrangements intra chromosomiques : l' $EBR_{\text{dommages chromosomiques}}$ dépasse 30 pour les ions fer (355). Les échanges inter chromosomiques se distribuent différemment selon la qualité de la radiation (356). Ajoutons que d'après les données issues des expériences in vitro en microscopie sur cellules vivantes, les domaines chromatiniens endommagés ne sont pas sujets à des mouvements amples (357). Au final, les réarrangements sont plus complexes (davantage de points de cassure, échanges intra et inter chromosomiques, létalité plus élevée illustrée par des courbes de survie linéaires) (358). Les radiations de TEL élevé déstabilisent plus facilement le façonnement des

extrémités libres de l'ADN au niveau des CDB, favorisant les évènements de recombinaison avec les télomères (surtout dans les lignées cellulaires déficientes) et promouvant ainsi davantage l'instabilité génétique (359).

La fraction de cellules survivant, à dose égale, à une irradiation par rayons X est plus élevée que celle de cellules irradiées par des particules accélérées.

Le nombre de CDB non réparables est plus important comme nous l'avons évoqué (360). Ce fait se traduit par « la linéarisation » de la courbe de survie (perte de l'épaulement β reflétant l'absence d'impact de dommages sublétaux)

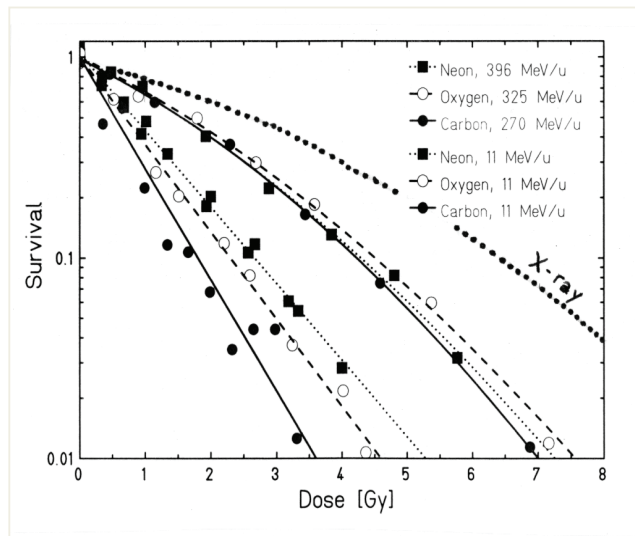


Figure 27 : Courbes de survie pour des cellules CHO de hamster: rayons X ou particules de TEL moyen (hautes énergie du canal d'entrée) ou particules de TEL élevé (région du SOBP), (GSI, Darmstadt, Allemagne).

Il en résulte deux propriétés fondamentales des particules chargées :

le fractionnement n'a peu ou pas d'effet (362) et les cellules - saines et tumorales - perdent leur radiosensibilité différentielle entre elles mais aussi selon la phase du cycle cellulaire.

Les modalités de mort cellulaire radio induite par les ions ne sont pas originales et comprennent avant tout la mort mitotique (363). Les faisceaux d'ions carbone peuvent induire l'apoptose de manière plus importante que les photons, indépendamment du statut p53 ou Bcl-2, via la voie des céramides (364), cependant l'augmentation du TEL ne change pas les proportions entre apoptose et mort mitotique, mais les fait apparaitre plus précocement qu'avec les photons (344)

Abordées de manière intégrative, les voies de signalisation cellulaire mises en jeu après irradiation particulaire diffèrent de celles que nous connaissons pour les photons (365-368) (Figure 28).

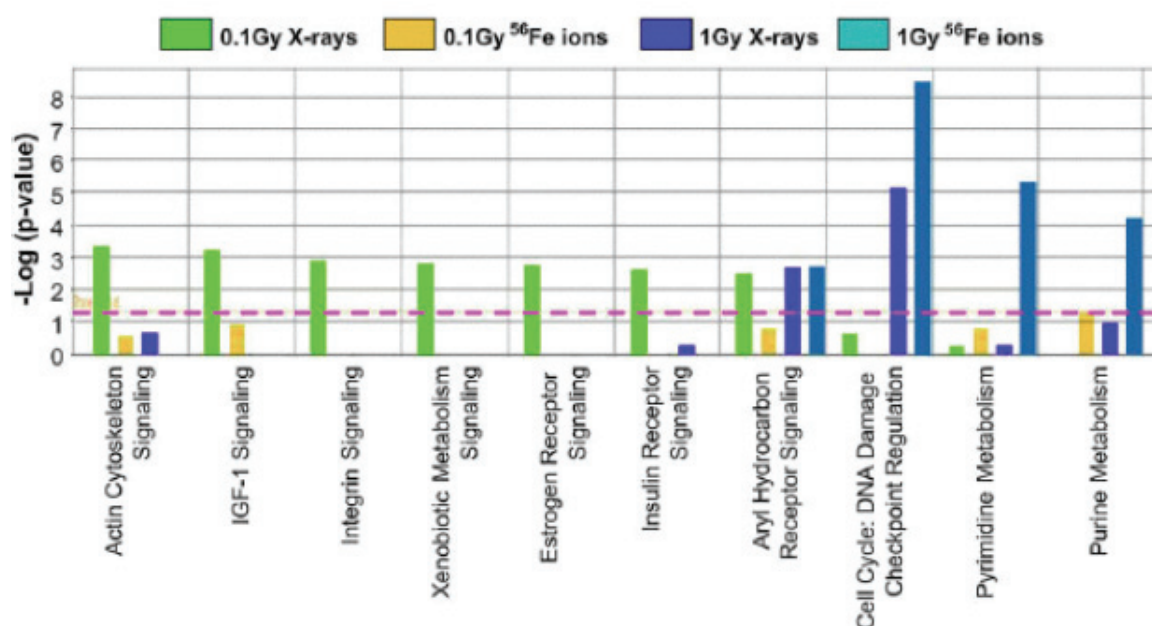


Figure 28 : Voies de signalisation activées après irradiation par ions fer et rayons X à la dose de 0,1 et 1 Gy ;cellules souches mésenchymateuses (seuil de significativité = ligne rose), d'après (368).

Globalement, les CDB plus complexes après irradiation à TEL élevé sont reconnues/réparées moins efficacement aboutissant à une létalité cellulaire supérieure aux radiation de TEL faible. Cette augmentation d'effet est quantifiée par la notion d'EBR_{mort cellulaire}.

5.2.3.2. Effets sur les tissus tumoraux

Les variations de radiosensibilité intrinsèque entre diverses lignées tumorales sont réduites lorsque les cellules sont exposées à un rayonnement à forte densité d'ionisation (369). L'EBR augmente pour les tumeurs possédant un ratio α/β faible en diminuant la radorésistance intrinsèque. Comme nous l'avons vu, L'importance de la composante β s'amointrit du fait de la moindre réparabilité des dommages (370, 371).

Soulignons que les tumeurs contiennent généralement un faible contingent de cellules en phase S (la plus radio résistante aux photons), a fortiori si elles sont bénignes (372). Le gain thérapeutique lié à l'indépendance au fractionnement est ici mitigé.

L'hypoxie est le principal facteur de radiorésistance et de promotion de l'instabilité génomique et donc un facteur d'agression tumorale avec un potentiel invasif et métastatique plus important. Ces aspects peuvent être possiblement aggravés après irradiation à faible TEL, via l'induction de HIF-1 (373). Les dommages de l'ADN sont sulfahydrilés dans ces conditions et mieux réparés, à l'origine d'une meilleure survie des cellules tumorales.

L'*oxygen enhancement ratio* (OER), défini comme le rapport des doses nécessaires pour obtenir un effet biologique donné selon que le système est en condition d'hypoxie ou de normoxie, est d'environ 3 pour les rayons X et compris entre 1 et 3 pour les ions, en fonction de leur transfert d'énergie linéique (374)(Figure 29). TEL et OER évoluent de manière inverse (375).

Soumises à une irradiation à TEL élevé, la complexité des dommages est telle que leur létalité dépasse les modulations dues aux conditions d'oxygénation du microenvironnement tumoral (376). Cependant un autre phénomène peut participer, à l'aide de simulations Monte Carlo, il fut calculé que la concentration initiale en O₂ le long de la trace d'ions carbone est 3 fois plus élevée que celle observée dans les régions tumorales hypoxiques, et même normoxiques aussi bien que dans les cellules humaines saines (377). Toutefois l'étalement du pic de Bragg dégrade cet effet, qui reste plus important pour les ions carbone par rapport aux neutrons ou aux protons (378, 379). Les tumeurs particulièrement hypoxiques apparaissent donc être d'excellents candidats à l'hadronthérapie, cette hypothèse est à l'origine historique de l'utilisation des neutrons.

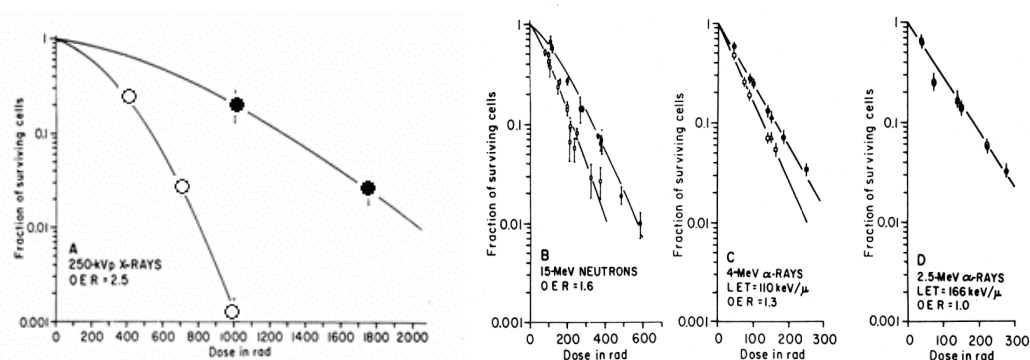


Figure 29 : Courbes de survie illustrant l'OER et son abolition avec la majoration du TEL; Cellules rénales humaines T1, hypoxie (cercles pleins), normoxie (cercles vides); d'après (380)

A la recherche des déterminants de la radiorésistance tumorale, il a été montré que les cellules cancéreuses constituant la masse tumorale sont plus radiosensibles que les putatives cellules souches (381). Ces cellules souches sont caractérisées par leur quiescence, leur propension à réparer plus rapidement les CDB, et à observer les points de contrôle du cycle cellulaire; elles sont situées volontiers dans des niches en conditions hypoxiques. Après irradiation conventionnelle, un enrichissement de la tumeur en ce dernier type cellulaire a été décrit. Les effets des ions carbone et des rayons X ont été comparés sur les cellules souches de cancer ORL en faveur d'une sur efficacité des ions à inactiver ces cellules particulièrement radio résistantes (382, 383). Ces résultats préliminaires ont été confirmés in vivo (384). Les ions carbone semblent donc capables de produire un effet homogène sur les différentes sous populations cellulaires des tumeurs (385).

Dans de nombreuses tumeurs solides, le microenvironnement est impliqué dans la promotion de la prolifération tumorale, l'invasion et le potentiel métastatique. Il semble exister des effets anti angiogéniques anti migratoires et anti métastatiques propres en réponse aux radiations de TEL élevé (386-390).

5.2.3.3. Effets sur les tissus sains

Très peu de données biologiques et en particulier d'EBR sont disponibles.

Toxicité tardive

Les tissus sains sont exposés à un risque de complication élevé s'ils sont irradiés à TEL élevé, heureusement ceci ne doit concerner qu'un volume faible du fait des propriétés balistiques des ions (391). Ce constat n'est absolument pas applicable aux neutrons et explique l'excédent de toxicité lié à leur courbe de rendement en profondeur (voir Figure 20).

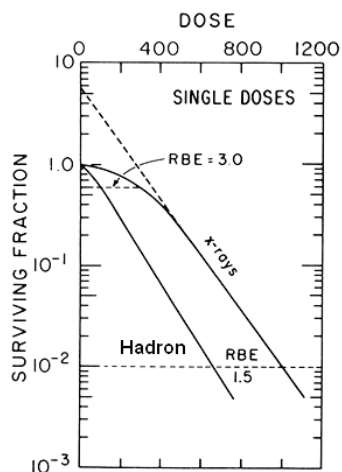


Figure 30 : Courbe de survie de cellules de mammifère en irradiation neutron à dose unique, d'après E.Hall; Lippincott Co, 1994.

Les tissus irradiés par radiations de TEL élevé ont une courbe dose-effet quasi linéaire quelle que soit leur architecture : l'effet du fractionnement disparaît comme nous l'avons vu.

Si l'on compare les mêmes tissus exposés à la fois aux photons et aux neutrons, les valeurs d' $EBR_{mort\ cellulaire}$ pour les tissus à renouvellement lent sont intrinsèquement plus élevées que pour ceux à renouvellement rapide (Figure 30). Les valeurs d'EBR pour la réponse des tissus à réponse tardive ont tendance à être majorées en dessous de 2 Gy/fraction en raison de leur augmentation avec la diminution de la dose par fraction (392). Ce phénomène ne correspond pas à une variation de l'efficacité des radiations à haut TEL en fonction de la dose par fraction

mais au contraire c'est la manifestation de l'épaule de la courbe de survie aux radiations à faible TEL qui sert de référence dans le calcul de l'EBR. C'est une des sources de complexité du concept d'EBR (Figure 31).

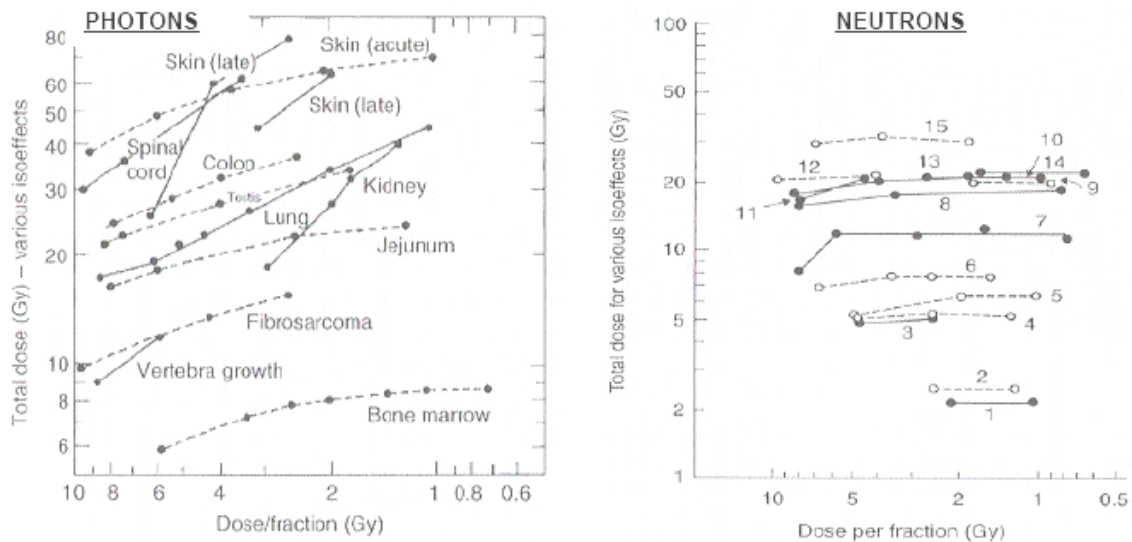


Figure 31 : Courbes iso effets pour les photons (gauche) et les neutrons (droite) selon le fractionnement pour divers types de tissus sains à réponse précoce (tirets) et tardive (traits pleins). Etudes in vivo sur modèles murins, d'après (7)

1 : fonction thyroïdienne, 2 : colonies hématopoïétiques, 3 : croissance vertébrale, 4 : colonies spermatogéniques, 5 : fibrosarcome, 6 : colonies jéjunales, 7 : fonction pulmonaire, 8 : racines nerveuses lombaires, 9 & 12 : desquamation cutanée, 10 : atrophie cutanée, 11 : télangiectasies, 13 : moelle épinière, 14 : nécrose de muqueuse orale, 15 : nécrose cutanée.

Sur le plan mécanistique, les dommages de l'ADN induits dans les cellules saines apparaissent moins réparables, surtout lorsque la dose par fraction est élevée dans la phase de plateau de la courbe de Bragg.

Il en résulte des coefficients α/β différents pour un même tissu selon le TEL de la particule. Ces valeurs d' α/β pour les tissus irradiés avec des particules de TEL élevé n'ont été que peu explorées. Lorsqu'on ne les connaît pas et que l'on désire comparer deux traitements de TEL élevé, la seule alternative est d'utiliser les données japonaises où la dose par fraction a été modifiée dans les études d'escalade de dose et où l'on dispose des données de doses iso efficaces. Notons la difficulté supplémentaire de variabilité des valeurs d' α/β tumorales du fait de l'hétérogénéité clonale de ces dernières contrairement aux tissus sains.

En aval, les ions carbone sont plus efficaces que les photons à induire la différenciation terminale des fibroblastes en fibrocytes capables de synthétiser de grandes quantités de matrice extra cellulaire et donc pourvoyeurs de fibrose (393). Globalement les particules de TEL élevé induisent les mêmes cytokines dans la fibrogénèse radio induite que les photons (394), ainsi qu'une apoptose retardée et une inflammation chronique dans les tissus sains murins (395).

Carcinogénèse radio induite

Les modèles d'étude mécanistiques de la carcinogénèse radio induite par les particules de TEL chargé sont multiples et souvent éloignés de la réalité clinique. Nous ne les passerons pas en revue. L'extrapolation de ces données in vitro doit donc être prudente. Il semble exister une association entre le TEL et l'EBR à générer des mutations et des aberrations chromosomiques avec un pic obtenu autour de 100 à 200 keV. μm^{-1} (Figure 32).

Ces données inquiétantes de prime abord sont à relativiser pour deux raisons :

(1) l'EBR létalité cellulaire augmente en parallèle pour les mêmes gammes de TEL. Ces deux aspects ont tendance à se neutraliser mutuellement et on peut montrer qu'à partir d'une certaine dose, facilement atteinte par les traitements tels qu'ils sont

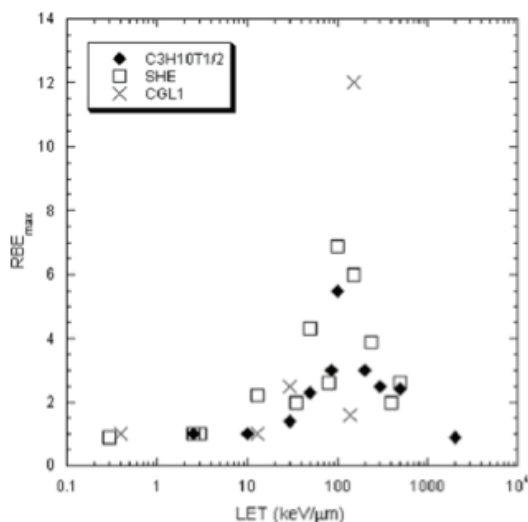


Figure 32 : Relation EBR carcinogénétique-TEL pour diverses lignées d'après (5)

proposés (peu de portes d'entrée et forte dose par fractions) l'effet létal l'emporte sur l'effet mutagène et il n'apparaît pas de risque aggravé de cancer secondaire (396).

(2) Le volume de tissus sains irradié à faible dose est très nettement réduit avec ce type de technique de sorte que, le sur risque cancérogène radio induit, s'il existe, ne concernerait que la zone du pic de Bragg étalé (zone péri tumorale immédiate) (397).

Les techniques d'irradiation modelant le faisceau à l'aide d'instruments interposés en amont du patient produisent des neutrons

secondaires indésirables de TEL élevé qui contribuent significativement à la dose délivrée en dehors des faisceaux. Bien que la dose physique soit faible, l'EBR carcinogène des neutrons secondaires est élevée et doit être prise en compte (398). Une étude comparant plusieurs modalités d'irradiation en photon- et proton thérapie a permis de mesurer une dose biologique équivalente apportée par les neutrons secondaires de l'ordre de 0.002 à 3 mSv par gray délivré (399). Cela peut représenter un équivalent de la dose maximale réglementairement admise pour un travailleur nucléaire en 5 ans ou encore 40 ans d'irradiation naturelle. Sur ce principe, une équipe a réalisé une simulation du risque cumulé de cancer secondaire pour l'espérance de vie restante (ex d'une patiente de 37 ans) après traitement en mantelet à la dose de 36 Gy d'une maladie de Hodgkin (400). Il s'agit d'une situation emblématique de sur risque cancérogène radio induit bien démontré par les études épidémiologiques; à 15 ans de suivi la population (souvent jeune) guérie de cette pathologie après RT présente en effet un sur risque relatif de second cancer qui varie selon les cohortes entre 20 et 100 (401). C'est avec la proton thérapie que le risque serait le plus faible en comparaison avec les traitements classiques par photon thérapie (400). Les auteurs dégagent de ces résultats une notion de « risque évitable » qui est nettement en faveur de l'hadronthérapie. Bien que nous disposions de peu d'études de ce type en carbone thérapie, il semble que la technique de balayage actif soit particulièrement protectrice (402).

Une subtilité supplémentaire mais non négligeable est apportée par le fait que les particules lourdes peuvent produire des neutrons lors de leurs interactions dans le patient mais en moindre quantité que les protons. En effet, les protons sont particulièrement efficaces car les transferts d'énergie sont favorisés à masse égale : les neutrons poussent les protons et les protons poussent les neutrons.

Ces études permettent d'expliquer pourquoi l'effet mutagène annoncé de l'hadronthérapie n'a pas été observé, et pourquoi il est vain de l'attendre encore compte tenu du recul qu'offrent les études les plus anciennes comme nous le verrons dans les résultats cliniques.

5.2.3.4. Modélisation

La modélisation de l'EBR des tissus affectés par l'irradiation est un pré requis nécessaire dans la planification du traitement et le calcul de doses iso efficaces. Des efforts importants ont été déployés pour générer des modèles physiques et biologiques car, en raison des déterminants complexes de l'EBR, il n'est pas possible de déterminer précisément, y compris *in vitro*, cette variable.

Au NIRS, au Japon, une approche expérimentale basée sur des mesures de l'EBR *in vitro* sur cellules tumorales de glandes salivaires (HSG) et l'expérience historique avec les neutrons rapides est utilisée pour les traitements réalisés en diffusion passive (encore la majorité). Une EBR tumorale clinique fixe de 3,0 est appliquée au milieu du pic de Bragg étalé (pour 10% de survie des cellules HSG) (403).

Avec le développement du balayage actif, et des traitements mixés, une approche micro dosimétrique est en cours de développement (MKM). Pour tenir compte de la variation de la radiosensibilité d'une lignée cellulaire, l'un des trois paramètres du modèle MKM est mesuré sur une seule courbe de survie puis utilisé dans l'optimisation biologique (404).

En Allemagne au contraire, le modèle d'effet local (*Local Effect Model* ou LEM) est basé sur l'hypothèse que le dommage biologique dans un sous volume du noyau cellulaire est uniquement déterminé par le dépôt d'énergie dans ce même sous

volume, indépendamment du type de rayonnement (405). De cette façon, il est possible d'utiliser les données de survie cellulaire existant avec les photons. Le LEM nécessite trois grandeurs pour le calcul de l'EBR: la taille de la cible critique dans la cellule (à savoir le noyau de la cellule), la structure de la trace pour le calcul de la distribution de dose physique locale, et un paramètre qui contient des informations sur la radiosensibilité du type cellulaire étudié, à savoir les rapports α/β dérivées du modèle linéaire quadratique décrivant les courbes de survie après irradiation X. Pour le calcul des valeurs de l'EBR tumorale, les coefficients α/β sont extrapolés à partir de données de survie clonogénique, alors que pour le calcul de l'EBR des tissus sains, ces coefficients sont extraits de données cliniques.

Conceptuellement, ces trois approches diffèrent fortement. La première offre une solution robuste et pragmatique, mais n'est pas adaptée au balayage actif et peine à montrer des perspectives d'évolution. La seconde incorpore les fluctuations de dose et s'adapte au balayage actif, cependant elle ne permet pas de décrire les dépôts de dose à l'échelle nanométrique et le terme β du modèle LQ demeure fixe quelle que soit la radiation utilisée. La troisième enfin est également adaptée au balayage actif mais présente l'inconvénient d'intégrer la dose dans des volumes si grands que le caractère d'effet local en est paradoxalement perdu. Ce modèle évolue et en est à sa quatrième version actuellement.

Il existe un grave défaut de données tissulaires. L'EBR clinique pondérée par des facteurs dépendant du traitement et du patient peut en outre s'avérer fort différente de l'EBR expérimentale. Il existe ainsi des incertitudes majeures dans la détermination des EBR à la fois pour les tumeurs et les tissus sains. Le retour d'expérience des années à venir eu égard à la dissémination de l'hadronthérapie et au recul par rapport aux premiers patients inclus dans les essais thérapeutiques devrait permettre d'apporter des données cliniques fondamentales pour l'alimentation des modèles mathématiques.

Des modèles alternatifs notamment à Lyon, sont en cours de développement en lien avec les approches micro- et nano dosimétriques (équipe de M Beuve).

Il découle des propriétés physiques et radiobiologiques des ions légers (mentionnées dans la Figure 33) les faits suivants qui conditionnent leurs indications électives:

- Les dommages radio-induits apparaissent plus complexes et moins facilement réparables qu'après une irradiation conventionnelle dans la zone du pic de Bragg. Ce surcroît d'efficacité cellulaire et tissulaire est quantifié par l'efficacité biologique relative (EBR). En corollaire, il n'existe pas ou peu d'effet

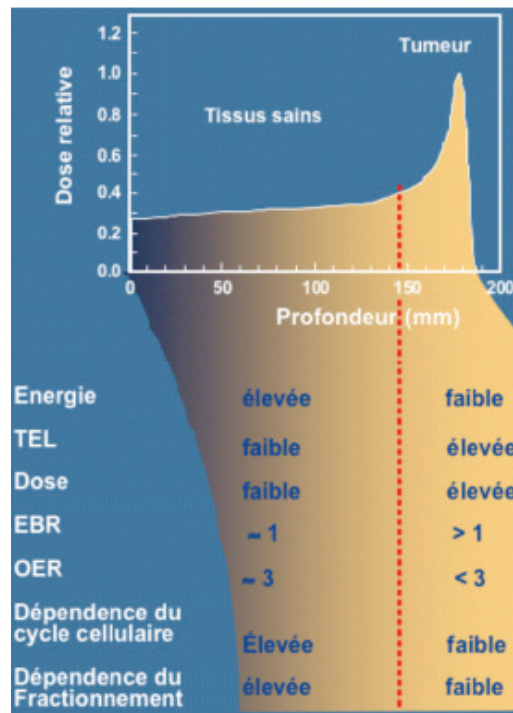


Figure 33 : Rationnel de l'hadronthérapie

différentiel entre les deux contingents cellulaires et tout tissu sain inclus en quantité importante dans le volume traité souffrira de complications en théorie plus péjoratives qu'avec les radiations de faible TEL (342).

- L'effet oxygène diminue lorsque le TEL augmente, annihilant l'*Oxygen Enhancement Ratio* (OER) ce qui permet en théorie d'être efficace contre des tumeurs hypoxiques.
- La radiosensibilité différentielle selon les phases du cycle cellulaire n'est plus observée. Les cellules très proliférantes perdent ainsi leur avantage relatif face aux cellules non proliférantes.
- Avec les « hadrons » chargés, la tumeur apparaît ciblée dans les trois dimensions du fait de la courbe de Bragg et la faible diffusion qui réduit la pénombre latérale. Le couloir d'entrée du faisceau est relativement épargné puisque les particules y sont rapides (zone d'EBR faible) et aucune dose n'est délivrée en aval du pic de Bragg, permettant une épargne tissulaire substantielle

5.3. Principales indications et résultats cliniques de l'hadronthérapie par ions carbone

Fort des fait que nous venons de décrire, les critères opérationnels pour retenir une indication de carbone thérapie ont trait au terrain du patient et aux caractéristiques de sa tumeur (radiatorésistance, organes à risque radiosensibles très proches, non opérabilité, stade locorégional et faible potentiel métastatique). Sur le plan radiobiologique, les indications privilégiées devraient être caractérisées par une prolifération lente, une capacité élevée à réparer les dommages, un ratio α/β faible et une radiatorésistance aux traitements conventionnels (406).

5.3.1. Indications

Les indications actuelles de la carbone thérapie ne sont, pour l'essentiel, pas appuyées sur des essais randomisés mais plutôt sur des séries prospectives de phase I/II et de phase II avec comparaisons historiques, (expérience des neutrons) (407). Toutefois, une certaine expérience clinique a été acquise en carbone thérapie grâce aux plus de 13 000 patients traités depuis 1994 au Japon et en Allemagne (et auparavant aux USA à Berkeley dès 1977).

Le retour d'expérience en hadronthérapie des Japonais et des Allemands a été publié conjointement en 2007 pour un panel d'indications (408, 409).

En France, une soixantaine d'indications « confirmées » a été retenue suite à une démarche d'étude et d'expertise indépendante. En fonction du niveau de bénéfice attendu et du niveau de preuve ces indications ont été encore divisées en trois groupes :

- les indications « consolidées » (\approx 1150 cas/an en France), avec des résultats publiés, émanant de l'expérience de la neutron thérapie, très largement au-dessus des valeurs des traitements non carbone (environ 20 à 25% de mieux en terme de contrôle local à 5 ans).
- les indications « prospectives » (\approx 4000 cas/an en France), satisfaisant le rationnel thérapeutique mais avec un recul insuffisant pour permettre une évaluation du gain thérapeutique

- les indications « exceptionnelles » (quelques cas très rares), véritables impasses thérapeutiques, qui n'ont pas été étudiées (Tableaux 18, 19 & 20)

Localisations tumorales	Définitions détaillées des indications	Modes d'hadronthérapie recommandées	Incidence estimée
Tumeurs des glandes salivaires (parotide)	Tumeurs inopérables <u>ou</u> refus de la chirurgie <u>ou</u> résections R2 <u>ou</u> rechutes locales [#] . Toute histologie : carcinomes adénoïdes kystiques, adénocarcinomes mucoépidermoïdes, carcinomes à cellules acineuses, etc.	Carbone exclusif ou en complément de dose d'un traitement locorégional par photons	≈ 100
Tumeurs des sinus de la face	Tumeurs inopérables <u>ou</u> refus de la chirurgie <u>ou</u> résections R2 <u>ou</u> rechutes locales. Adénocarcinomes et carcinomes adénoïdes kystiques.	Carbone exclusif dans le site primitif	≈ 250
Carcinomes adénoïdes kystiques avec extension à la base du crâne	Tumeurs inopérables <u>ou</u> refus de la chirurgie <u>ou</u> résections R2 <u>ou</u> rechutes locales.	Carbone exclusif dans le site primitif	≈ 10
Mélanomes malins muqueux (ORL essentiellement)	Toute localisation sans métastases immédiatement menaçantes. Tumeur si possible non opérée <u>ou</u> en urgence après résections R2 ou en rechute locale non irradiée.	Carbone exclusif dans le site primitif. Traitement urgent	≈ 40
Chordomes de la base du crâne du rachis et du sacrum	Toute forme clinique	Carbone <u>ou</u> protons exclusif dans le site primitif	≈ 30 à 50
Chondrosarcomes du squelette axial	Base du crâne	Protons exclusifs dans le site primitif	≈ 20
	Rachis et sacrum	Protons <u>ou</u> carbone exclusifs dans le site primitif	< 10
Sarcomes des tissus mous (non rétropéritonéaux)	Grade faible et M0, toute histologie, tout site. Non résécables <u>ou</u> chirurgie refusée <u>ou</u> "R2 définitif" : R2 sans reprise possible ou R2 après reprise chirurgicale ou rechute locale en résection R2.	Carbone exclusif dans le site primitif	≈ 100
	Situation M+ non menaçante avec T or rT invalidantes.		≈ 80
Sarcomes rétropéritonéaux	Après rechute locale <u>et</u> reprise chirurgicale : "R0" ou R1 et M0 (pour les T non résécables et R2 voir précédemment) .		≈ 40
	Situation initiale: R1 M0		≈ 200
Sarcomes des tissus mous de la tête, du cou et des membres	"R1 définitif": résection R1 sans possibilité acceptable de reprise chirurgicale.		≈ 10
Ostéo- et chondrosarcomes (tout site sauf squelette axial)	Tumeurs non opérées <u>ou</u> résections R2, M0. M+ accepté pour les ostéosarcomes seulement. Discussion en fonction du grade.		≈ 200
Rechute pelvienne d'adénocarcinomes du rectum	Rechutes pelviennes uni localisées locorégionales non résécables, en territoire irradié ou non, <u>et</u> M0 (TDM, IRM hépatique et TEP).	Carbone exclusif	≈ 200
Hépatocarcinome	Hépatocarcinome unique, $\varnothing > 4$ à 5 cm, non résécables, M0, ne pouvant être traité ni par les moyens classiques ni par photon thérapie, sans Co morbidité menaçante.	Carbone exclusif dans le site primitif	≈ 50

Tableau 18 : Indications consolidées (source GCS ETOILE)

Localisations tumorales	Définitions détaillées des indications	Modes d'hadronthérapie recommandées	Incidence estimée
Cancers bronchiques non à petites cellules	Situation initiale inopérable, Stade (UICC/AJC 1997) I A et IB: T1T2N0 (TDM et TEP) M0 (IRM cérébrale). Les tumeurs exclusivement endobronchiques sont exclues	Carbone exclusif dans le site primitif avec <i>gating</i> respiratoire	≈ 750 à 1000

Localisations tumorales	Définitions détaillées des indications	Modes d'hadronthérapie recommandées	Incidence estimée
	Second cancer chez des patients antérieurement traités par RT et/ou pneumonectomie depuis > 2 ans. Stades I non opérables Situation initiale inopérables, Stade (UICC/AJC 1997) IIB-III B restreints aux T3T4N0 (TDM et TEP) M0 (IRM cérébrale). Les tumeurs exclusivement endobronchiques sont exclues Second cancer chez des patients antérieurement traités par RT et/ou pneumonectomie depuis > 2 ans. Stades II non opérables		
Cavum / nasopharynx	Toute histologie Rechutes strictement locales [#] après une première irradiation	Protons or carbone	≈ 10
Gliomes de haut grade (grade III ou glioblastomes)	Rechute après un traitement initial par RT +/- chimiothérapie et en progression sous chimiothérapie.	Carbone exclusif dans le site primitif	≈ 50
	Traitement initial éventuellement après chirurgie		≈ 300
Carcinomes épidermoïdes ORL	Rechutes ou deuxième localisation non résécables, en territoire irradié et M0 (TDM, IRM hépatique et TEP) (<i>proposition à expertiser</i>). Situation initiale T3-T4, N ≤ 2, M0 de l'oropharynx ou de la cavité buccale (<i>proposition à expertiser</i>).	Carbone exclusif	≈ 500
Adénocarcinomes de la prostate	Groupe à risques intermédiaires : T2b, T3a/b et (PSA 10 à 20 et/ou Gleason ≥ 7) et pN0	Comparaison RTMI ± hormonothérapie vs carbone vs protons	≈ 1000
Tumeurs digestives très radio résistantes	Cholangiocarcinome nodulaire unique ou adénocarcinome du pancréas, non résécables, M0, non antérieurement irradié et non progressif sous chimiothérapie depuis 4 à 6 mois.	Carbone exclusif ou en complément de dose d'un traitement locorégional par photons	≈ 900
	Tumeur endocrine du pancréas M0, progressive après traitements multiples : isotopique et/ou chimiothérapie et somatostatine.		≈ 20

Tableau 19 : Indications « prospectives » (source GCS ETOILE)

Localisations tumorales	Définitions détaillées des indications	Modes d'hadronthérapie recommandées	Incidence estimée
Tumeurs pédiatriques	Sarcomes d'Ewing pelviens inopérables volumineux (plus de 100 ou 200 mL selon l'âge) ; Chordomes agressifs du jeune enfant (< 3-4 ans) ; Ostéosarcomes non résécables du bassin.	Carbone exclusif dans le site primitif	< 100
Sites divers, hautement fonctionnels	Maladies tumorales bénignes ou malignes localement invasives invalidantes et à haut potentiel de rechute locale (p.ex. : tumeurs desmoïdes, neurinomes, schwannomes, méningiomes...)	Carbone exclusif	Très rare

Tableau 20 : Indications exceptionnelles (source GCS ETOILE)

Le bénéfice dosimétrique des « hadrons » peut sembler évident comme l'atteste la Figure 34; toutefois s'agissant d'une modalité intégrant des aspects radiobiologiques innovants, il existe une pression en faveur d'une validation des résultats comme s'il s'agissait d'un traitement nouveau dans le cadre d'essais cliniques comparatifs prospectifs contrôlés malgré les difficultés soulevées par de nombreux auteurs (410, 411). Nous reviendrons sur ce point dans la discussion.

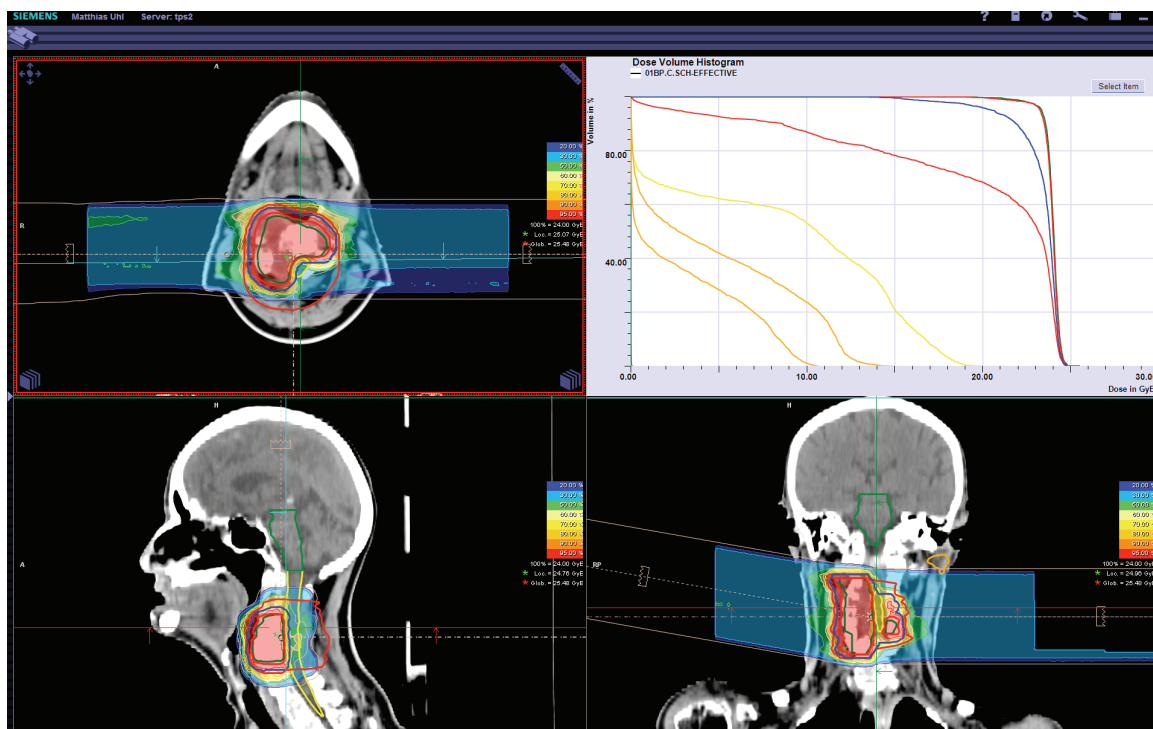


Figure 34 : Dosimétrie d'une carbone thérapie exclusive à l'encontre d'un chordome cervical inopérable traité à HIT (donnée personnelle)

Nous ne détaillerons pas le bénéfice de l'hadronthérapie en termes d'efficacité anti tumorale. En revanche nous donnons ci-après les principales données de toxicité, en particulier tardive, recensées dans la littérature.

5.3.2. Données cliniques de toxicité tissulaire et seconds cancers

Les traitements de tumeurs radio résistantes nécessitant évidemment une forte dose biologique exposent à des toxicités tardives au niveau des tissus sains situés au contact ou même *dans* la tumeur. C'est par exemple le cas de neuropathies périphériques dans le traitement des tumeurs para spinales ou de certains sarcomes. Le risque de cancer secondaire a été évoqué tout au long de l'histoire du développement de l'hadronthérapie ; tantôt évoquant un risque important qu'aucune donnée objective ne vient appuyer après plus de 10 000 patients traités en carbone et plus de 100 000 en proton ; tantôt évoquant un recul insuffisant alors qu'il y a plus de 50 ans de recul depuis les premiers traitements par protons et par hélium aux USA.

Une compilation des essais de la littérature (neutron thérapie exclue) fut réalisée en 2009. De manière globale, et sous réserve d'un faible nombre d'études de niveau de preuve élevé, aucun excédent de toxicité n'a été retrouvé (407).

L'expérience américaine est la plus intéressante à cet égard car elle cumule trois avantages :

- Le recul indiscutable (>50 ans) ;
- La variété des particules utilisées (dont des particules plus lourdes que le carbone (néon, argon, silicium) qui sont considérées du point de vue de la radioprotection comme plus carcinogènes que le carbone) ;
- Le suivi des données dans un pays sensibilisé à la sécurité sanitaire.

Une étude récente a recensé l'incidence des toxicités tissulaires tardives au sein de la cohorte de patients traités jusqu'en 1992 à Berkeley. Elle comptait 516 survivants en 1992 pouvant fournir des données exploitables.

La majorité des études publiées par les équipes du BEVALAC ont objectivé une incidence d'effets tardifs après proton- ou "hélium thérapie" comparable à ce qui est observé pour une dose équivalente de photons (412). On peut retenir un risque d'environ 1% de cancer secondaire en "hélium thérapie" (particule plus lourde que les protons, mais moins que les carbonés) et en "néon thérapie" (particule plus lourde que les carbonés). Compte tenu des populations observées, l'intervalle au seuil de 95% de confiance de ce risque est de 0,14% à 1,86% (334).

Les résultats des études plus récentes réalisées au Japon et Europe semblent confirmer ces données.

- Aucune toxicité tardive de grade 3 n'est à déplorer dans les études d'irradiation des carcinomes adénoïdes kystiques de Schultz-Ertner de 2003 et 2004 (413).
- Les données tardives de 155 patients porteurs d'un chordomes de la base du crâne viennent d'être publiées. Avec un recul médian de 7,3 ans, aucune toxicité de grade 3 tardive n'a été observée après irradiation avec des ions carbone à la dose médiane de 60 Gy_{isoE} (fractions de 3 Gy_{isoE}). Aucun cancer radio induit n'est à déplorer (414).
- Au Japon, l'incidence des toxicités de grade ≥ 2 (RTOG) est de l'ordre de 4%. Seul 1 patient sur l'ensemble des patients inclus dans ces études a présenté une

toxicité de grade 4 de nature cutanée qui a pu être résolue par une greffe de peau.

(Tableau 21)

Site / type de tumeur	Protocoles	Doses et fractionnements	Taux de toxicité tardive	Remarques
Skull base Chordomas (n = 76)	Phase I/II 4-1997 to 2-2004 n=28 Phase II 2004 to 2-2011 n = 48	48 to 60.8GyE / 16fr 60.8GyE/16fr	3 cases of brain grade II	Median follow-up 46 months (range 3 – 158)
Head & Neck tumors of diverse types (ACC, MM, SCC, ADC, etc) excluding sarcomas (n = 404)	Phase II protocols 9301 / 9504 / 9602 From 6-1994; 4-1996 and 4-1997	57.6GyE/16fr (n = 265) 64.0GyE/16fr (n = 142)	8 cases of skin grade II (2%) 14 cases of mucosal grade II (4%)	Median follow-up > 50 months
Head & Neck soft tissue sarcomas (n = 39)	Phase I/II protocol 0006, from 4-2001 to 2-2008 n=41	70.4GyE/16fr	For n = 39; No grade II or more reaction	Follow-up of more than 6 months
Mucosal malignant melanoma (n = 103)	Phase II protocol 0007; from 4-2001 to 2-2011 n= 103	57.6GyE/16fr + chemotherapy DAV	For n = 103; No grade II or more reaction	Follow-up of more than 6 months
Lung cancers (n = 129)	Phase II protocols 9802 / 0001 From 4-2003 to 8-2010	36.0 to 46.0GyE/one fr	For n = 128; skin reactions: 126 G I; 1 G II; 1 G III For n = 126; lungs reactions: 116 G I; 3 G II; 0 G III ou IV	Median follow-up 51 months (range 2.5 – 70)
Bone and soft tissue sarcomas, Including chordomas (n = 514)	Phase I/II 6-1996 to 2-2000 n=57 Phase II 4-2000 to 2-2011 n = 500	52.8 to 73.6GyE/16fr 70.4GyE/16fr	For n = 506; skin reactions: 4 G0; 475 G I; 20 GII; 6 GIII; 1 GIV; 0 GV. For n = 439; Gastro-intestinal tract reactions: 437 G0; 2 G I; no GII GIII GIV GV. For n = 46; Spinal Cord reactions: 45 G0; 0 G I; 1 GII; no GIII GIV GV.	Median follow-up ≈ 42 months (range 13 – 112)
Subgroup of sacral chordomas (n = 95*) * Not accounted in total	From 1996 to 2007	52.8 to 73.6GyE/16fr	For n = 95; 2 cases of GIV skin reaction requiring a skin graft; 15 cases of GIII sciatic nerve complications	Median follow-up ≈ 42 months (range 13 – 112). After 2007, 88 more cases have been treated with less toxicity (3 ports, 70.4GyE/16fr)
Liver cancer (n = 226)	Many protocols from 1995 to 2006; dose escalation and nbr of fractions reduction. Standard protocol: 52.8GyE/4fr	79.5GyE/15fr to 38.8GyE/2fr	For n = 226; No case of grade IV hepatic tox. Child-Pugh score increased of ≥ 2 points in 5% and 7% of resp the small and large tumor group (≤ or > 5 cm).	Follow-up of more than 3 months
Recurrent rectal cancer, after initial surgery alone (n = 140)	Phase I/II 4-2001 to 2-2004 n=38 Phase II 4-2004 to 2-2010 n = 102	Dose escalation: 67.2 to 73.6GyE/16fr Standard: 73.6GyE/16fr	For n = 102; The only late effects were 4 cases of pelvic abscess after tumor necrosis. (no relapse)	Follow-up of more than 3 months
Recurrent rectal cancer, after initial surgery and radiotherapy (n = 23)	Phase II	70.4GyE/16fr	For n = 23; Late effects were 6 cases (26%) of peripheral neuropathy and infection.	Follow-up of more than 3 months
Prostate cancer (n = 1305)	Phase I/II studies then phase II and standard	66.0GyE/20fr n = 250 63.0GyE/20fr n = 216 57.6GyE/16fr n = 539	Late tox ≥ Grade II; rectum and GU: 3.2 and 13.6% 2.3 and 6.1% 0.6 and 1.9%	Follow-up of more than 12 months

Site / type de tumeur	Protocoles	Doses et fractionnements	Taux de toxicité tardive	Remarques
Total: n = 2959			Late tox \geq Grade II: n' = 3523 exposed sites in treated patients n'' = 140 observations of late toxicities 4% (n''/n')	

Tableau 21 : Tolérance rapportée par les principaux essais cliniques japonais [JBalosso, GCS-ETOILE, 2013].

De manière évidente, la carbone thérapie apparaît moins toxique que les traitements par photons réalisés pour des situations comparables, à savoir des traitements à intention curatrice de tumeurs en place (415). Le risque de cancer radio induit se situe entre 1 pour mille et 2 pour cent patients traités. Compte tenu des indications curatrices qui sont retenues pour l'hadronthérapie, ce risque est négligeable et se compare très avantageusement au risque chirurgical ou médical en chimiothérapie (416).

La majorité des données rapportées en hadronthérapie jouit encore d'un niveau de preuve faible. Il est non moins évident qu'il ne faut pas comparer ces résultats à ceux de la RT standard réalisée en intention prophylactique qui se doit d'être absolument non toxique, et qui concerne aujourd'hui près de 40% des indications.

5.4. Efficiences économique

L'hadronthérapie engendrerait un coût moyen par patient de 35 000€. En effet, le coût de construction d'un centre de traitement combinant proton- et hadronthérapie par ions carbone est estimé à 130 M€ (335). Ce coût important est lié à la taille et à la complexité des structures et technologies mises en œuvre; les frais de fonctionnement sont également élevés pour une capacité de traitement encore limitée. La dissémination de la technologie devrait permettre de réduire ces coûts.

Trois points méritent ici d'être soulignés :

- l'hadronthérapie par ions carbone est réalisée en intention curative offrant pratiquement toujours un bénéfice aux individus d'une population très ciblée (contrairement aux traitements prophylactiques et adjuvant qui réduisent une

probabilité de rechute, souvent déjà faible après la chirurgie) ; A contrario, une grande part de la RT conventionnelle est dévolue soit à des traitements palliatifs (près de 20%) soit à des traitements adjuvants, prophylactiques ou complémentaires de la chirurgie (près de 40%) dont l'impact sanitaire est de plus en plus réduit en terme de capacité curatrice du fait des progrès conjugués du dépistage précoce, de la chirurgie et de la chimiothérapie adjuvante.

- l'hadronthérapie par ions carbone se déroule sur une durée brève et se révèle peu toxique : 4 à 6 semaines de prise en charge évitant d'importants surcoûts liés à la durée des traitements, aux déplacements et aux traitements de support associés (anti nauséux, facteurs de croissance hématopoïétiques, chambres veineuses implantables, traitements des complications, etc.) non comptabilisés dans ces comparaisons;

- l'hadronthérapie par ions carbonés s'adresse à un groupe particulier de tumeurs dont le nombre est considérablement plus réduit que pour les thérapies médicales, tout au plus quelques milliers de patients par an (1500 à 2000 pour la population actuelle et après 5 à 10 ans de progression).

Les études médico-économiques sont quasi inexistantes et le rapport coût-efficacité de l'hadronthérapie est difficile à estimer devant le faible nombre d'essais randomisés l'ayant évaluée (417). La différence entre la RT conventionnelle et l'hadronthérapie en termes de coût par guérison supplémentaire n'est pas aussi considérable qu'il y paraît de prime abord. Il est même assez facile de démontrer que dans le strict respect des indications électives, l'hadronthérapie peut être plus « *cost effective* » que les traitements classiques (418, 419).

Approche générale de l'équipe d'accueil

Le groupe de radiobiologie Inserm CRU1052 a pour vocation de mieux comprendre les conséquences biologiques de l'exposition aux fortes doses (RT) et aux faibles doses (radiodiagnostic, industrie et espace) de radiation en étudiant plus particulièrement l'impact du facteur individuel dans la réparation et la signalisation des dommages de l'ADN.

L'équipe d'accueil développe des hypothèses à partir de modèles et de conditions expérimentales réalistes : cellules humaines non transformées, respect de la physiopathologie des phénomènes étudiés. La méthodologie sera plus amplement justifiée dans la discussion de ce manuscrit.

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

En 2003, des techniques d'immunofluorescence avec un biomarqueur appelé H2AX permet de détecter chaque CDB dans chaque noyau de cellules (234). Toutefois, à ce moment, aucun élément ne permettait de déterminer si les foci pH2AX reflétaient l'ensemble des CDB ou au contraire, les seules CDB reconnues par la suture. Une dose de 1 Gy de rayons X produisant environ 40 CDB par cellule, cette technique permet aux radiobiologistes de mesurer des effets de l'ordre du mGy ou mSv selon les circonstances d'exposition. L'analyse des effets biologiques de doses de radiation compatibles avec certaines expositions professionnelles ou médicales devint alors possible. Depuis 1995 et la thèse de Nicolas Foray puis à partir de 2003, l'équipe d'accueil alors implantée sur le site du synchrotron européen de Grenoble (ESRF) commença à rassembler ce qui est aujourd'hui l'une des plus grandes collections de fibroblastes humains provenant de syndromes génétiques associés à une radiosensibilité significative. À travers le projet sur fonds propres CELLINE, le laboratoire d'accueil entreprit d'étudier l'induction et le rythme de réparation des CDB en utilisant plusieurs techniques comme l'électrophorèse en champs pulsés et l'immunofluorescence pH2AX. En plus du marqueur H2AX, d'autres furent utilisés,

notamment pDNA-PK et MRE11 pour mesurer respectivement l'activité kinase DNA-PK impliquée dans la suture et l'activité endonucléase de MRE11.

En 2008, à partir de 40 lignées fibroblastiques représentant 8 syndromes génétiques différents, La valeur de la survie clonogénique à 2 Gy (SF2) (dose d'une fraction de RT classique) apparut comme inversement proportionnelle au taux de CDB non réparées à 24 h, quelle que soit la mutation du gène considéré ou la technique utilisée. Cette loi semble également valable pour toutes les cellules de mammifères (420). A la suite de ces résultats, le laboratoire d'accueil a proposé une première classification en 3 groupes sur la base des valeurs de SF2, du taux de CDB non réparées après une dose de 2 Gy quantifiée par le nombre de foci pH2AX et du taux de foci MRE11: groupe I, radorésistance ; groupe II, radiosensibilité modérée ; groupe III : hyper radiosensibilité (420) (Figure 35).

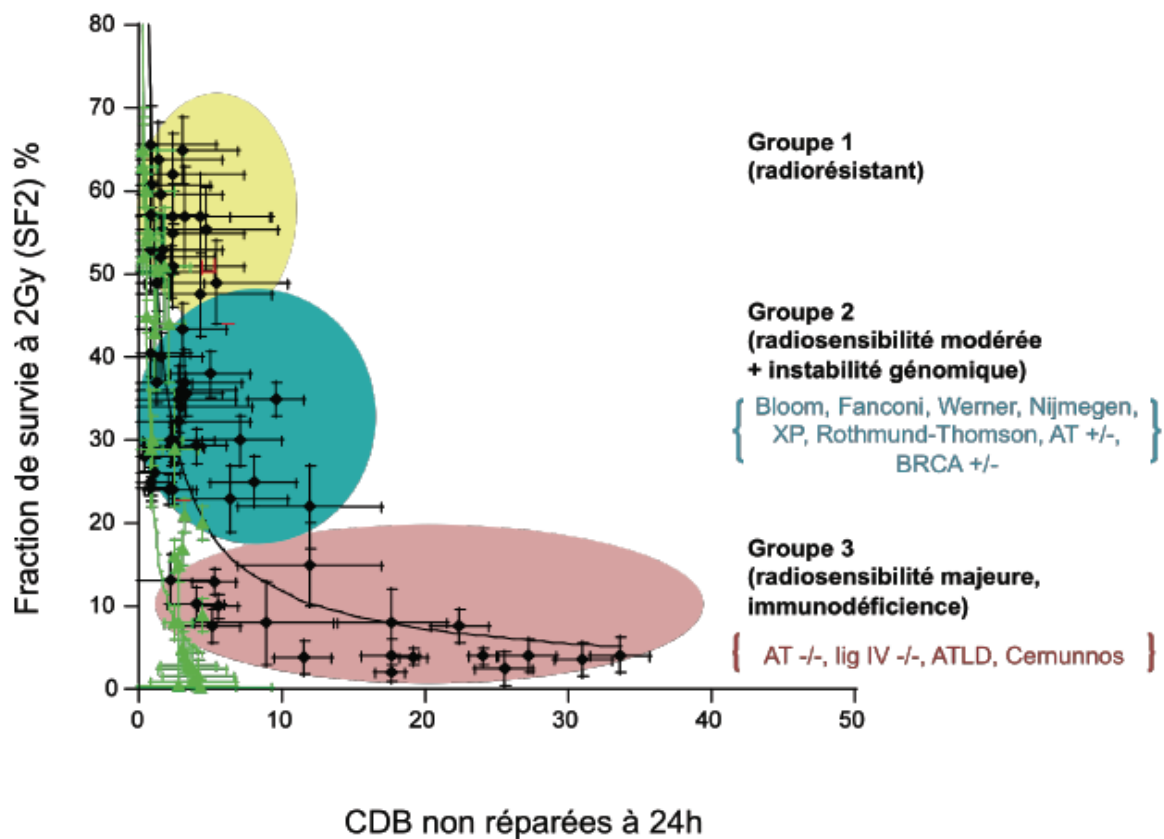


Figure 35: Classification de la radiosensibilité en 3 groupes proposée par l'équipe d'accueil sur la base des CDB non réparées à 24h.

1.2. Une voie de réparation alternative

L'immunofluorescence pH2AX prédit moyennement les radiosensibilités modérées de syndromes associés à une forte prédisposition au cancer et à une réparation « presque » normale, suggérant ainsi l'existence d'un mode de réparation alternatif à la suture, actif en G0/G1. Ces radiosensibilités intermédiaires apparaissent associées à des nombres de foci MRE11 anormaux. MRE11 est une nucléase dont l'activité est inhibée par l'activité kinase ATM. Dans la plupart des cas de syndromes associés à de fortes prédispositions de cancer (mutations de BLM, FANC, XP, etc...), l'activité nucléase de MRE11 n'est pas régulée et est corrélée au phénomène d'hyper recombinaison (259).

1.3. Des syndromes radiosensibles sans mutation de gène de réparation des dommages radio induits

Parmi les maladies congénitales associées à une hyper radiosensibilité individuelle (voir Tableau 10) et les lignées fibroblastiques de la collection CELLINE, la plupart présentent une mutation homozygote d'un gène impliqué dans la signalisation et/ou la réparation des CDB radio induites. Pourtant, quelques syndromes radiosensibles comme la progeria, la chorée de Huntington ou la neurofibromatose ne sont pas causés par des mutations de gènes de réparation des dommages de l'ADN. Ces syndromes concernent plutôt des gènes codant pour des protéines impliquées dans la signalisation du stress et le trafic intracellulaire entre le cytoplasme et le noyau :

- la Huntingtine est une protéine de transport vésiculaire cytoplasmique ayant une action antiapoptotique (421).
- la Neurofibromine 1 est une protéine de transport cytoplasmique inhibant la voie Ras (422).
- la Lamine A est une protéine de structure de la membrane nucléaire, impliquée dans la régulation transcriptionnelle (423) ; Le phénotype peut être réversé par les inhibiteurs de farnésyltransférases (IFT).

En parallèle le groupe a collaboré avec une équipe espagnole sur la physiopathologie de la progeria (424). Des formes farnésylées tronqué de prélamine

A s'accumuleraient à la face interne de l'enveloppe nucléaire. Le phénotype progéroïde, et en particulier la radiosensibilité associée, apparaît complétementée par les IFT renforçant les soupçons sur les anomalies du trafic nucléo-cytoplasmique dans les réparatoses sans anomalie fonctionnelle de réparation. Récemment un essai clinique a permis d'objectiver des résultats encourageants sur une cohorte d'enfants traités pendant au moins deux ans par un IFT (425).

De manière concomitante, il a été démontré que les inhibiteurs de HMG CoA réductase avaient un effet radio protecteur tissulaire (426).

Ces données préliminaires semblent ainsi remettre en question le dogme de la localisation nucléaire exclusive d'ATM (159, 160). Une fonction cytoplasmique d'ATM semble exister et le trafic nucléo-cytoplasmique de la protéine semble critique dans la radiosensibilité cellulaire.

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

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

- L'accumulation de données systématiques sur l'ensemble des protéines qui forment des foci nucléaires, en particulier de pATM, marqueur de l'auto(trans)phosphorylation de la protéine ATM
- La collecte de fibroblastes issus de patients traités par RT et ayant éprouvé une radiosensibilité clinique significative sous la forme de réactions tissulaires plus sévères ou précoces qu'attendu pour la majorité des patients traités. Ce projet sur fonds propres fut appelé COPERNIC (Collection pour l'étude de la radiosensibilité au niveau clinique).

Buts de la thèse

1. Contexte personnel

Au cours de mon double cursus médico-scientifique initial et de deux mobilités aux Etats-Unis, j'ai pu acquérir des compétences théoriques et pratiques en proton thérapie et en radiobiologie, en particulier spatiale. Ma thèse d'exercice m'a permis de développer les problématiques communes à l'exposition professionnelle des spationautes et celle des patients aux ions légers à visée thérapeutique. Soucieux d'optimiser ma formation initiale, j'ai réalisé en 2009 un stage hors subdivision au Centre Léon Bérard de Lyon avec du temps détaché pour participer au développement du Centre ETOILE. Au même moment, j'ai recherché un laboratoire de radiobiologie susceptible de m'encadrer et de me permettre de travailler sur les thématiques qui me sont chères avec des modèles et des techniques réalistes. J'ai ainsi pu rejoindre un des rares groupes de radiobiologie français qui réponde à ces critères, sur un sujet traitant de concepts radiobiologiques novateurs à la base d'une approche diagnostique prédictive de la radiosensibilité individuelle. Le financement indispensable pour l'inscription universitaire m'a été proposé par l'Université Claude Bernard en échange de mon implication dans le projet européen ULICE. Il s'agit d'un projet de développement, d'échange et d'harmonisation des pratiques de l'hadronthérapie par ions carbone en lien avec le centre ETOILE et les équipes de recherche locales du PRRH (Programme Régional de Recherche en Hadronthérapie). Un sujet commun autour de la problématique de l'optimisation de la toxicité de la RT pouvait alors être dessiné.

En parallèle de mon activité de recherche, j'ai poursuivi mon activité clinique à l'Institut de Cancérologie de Lorraine où je me suis progressivement spécialisé dans le traitement des sarcomes et des tumeurs neurologiques et pédiatriques pour lesquelles l'hadronthérapie par ions carbone présente de fortes perspectives de développement. A travers cette activité de recours, je suis devenu le premier adresseur français dans les centres d'hadronthérapie européens et également le premier pourvoyeur de biopsies cutanées de patients suspects de radiosensibilité excessive.

Les techniques avancées (IMRT, VMAT, stéréotaxie) de RT externe utilisant des faisceaux de photons (rayons X) offrent une répartition spatiale de dose plus avantageuse qu'antérieurement, permettant de réduire le volume de tissus sains irradiés à forte dose et donc la fréquence et la sévérité des toxicités. Dans trois cas de figure, ce gain thérapeutique peut toutefois s'avérer insuffisant :

- lorsqu'un gradient de dose abrupt est difficile à obtenir en marge d'un volume tumoral en contact intime avec des tissus sains particulièrement critiques, du fait des propriétés physiques des photons,
- lorsque la tumeur à traiter est très radio résistante, excédant de loin la tolérance des tissus voisins, l'effet différentiel avec les photons devient défavorable,
- lorsqu'un patient présente une radiosensibilité individuelle excessive.

Deux approches développées dans nos équipes d'accueil permettent d'apporter des solutions à ces situations.

1.1. Hadronthérapie

Dans les deux premiers cas, l'hadronthérapie, en utilisant des faisceaux de protons ou d'ions carbone permet de traiter des tumeurs malignes ou bénignes intrinsèquement radio résistantes et/ou placées au sein d'organes à risque radiosensibles que les radiations ionisantes conventionnelles ne parviennent à contrôler. L'hadronthérapie par ions carbone s'intéresse à des indications sélectionnées par rapport à la radiorésistance relative des tumeurs cibles et/ou leur localisation au sein ou à proximité de tissus sains plus radiosensibles, et ne pouvant être traitées par RT conventionnelle. Elle offre ainsi les possibilités balistiques et radiobiologiques les plus avantageuses dans le domaine de la RT externe, optimisant l'épargne tissulaire pour toutes les gammes de dose.

Le coût de l'hadronthérapie par ions carbone s'avère supérieur aux techniques conventionnelles en lien notamment avec un investissement technologique majeur nécessaire pour produire, transporter, modeler et contrôler les faisceaux d'ions légers. Le développement de cette technique se trouve donc le plus souvent adossé

à des programmes de recherche dans des champs aussi variés que la physique des particules, l'imagerie, la modélisation, l'instrumentation ou la radiobiologie, qui concourent également à améliorer la RT conventionnelle. **L'implémentation de nouveaux centres, statistiquement nécessaire pour offrir un accès au soin acceptable à l'ensemble de nos concitoyens et conforme à l'état de l'art, nécessite une mise en commun des savoirs et savoir-faire scientifiques.**

Ce coût doit être mis en perspective avec le service rendu pour le patient et la Société qui, à l'instar de toute intervention médicale, doit être évalué au moyen d'études prospectives comparatives et ici nécessairement multicentrique. En effet les indications préférentielles de la carbone thérapie ont été retenues essentiellement sur la base de données cliniques rétrospectives ou issues de séries mono centriques de faible effectif au sein de phases I/II du fait de la rareté des situations (Figure 37). Ici aussi une mise en commun des données médicales s'impose. **Pour que cet objectif soit réalisable, les traitements et les données cliniques devront être parfaitement comparables ce qui impose une harmonisation des concepts, des protocoles et des pratiques.**

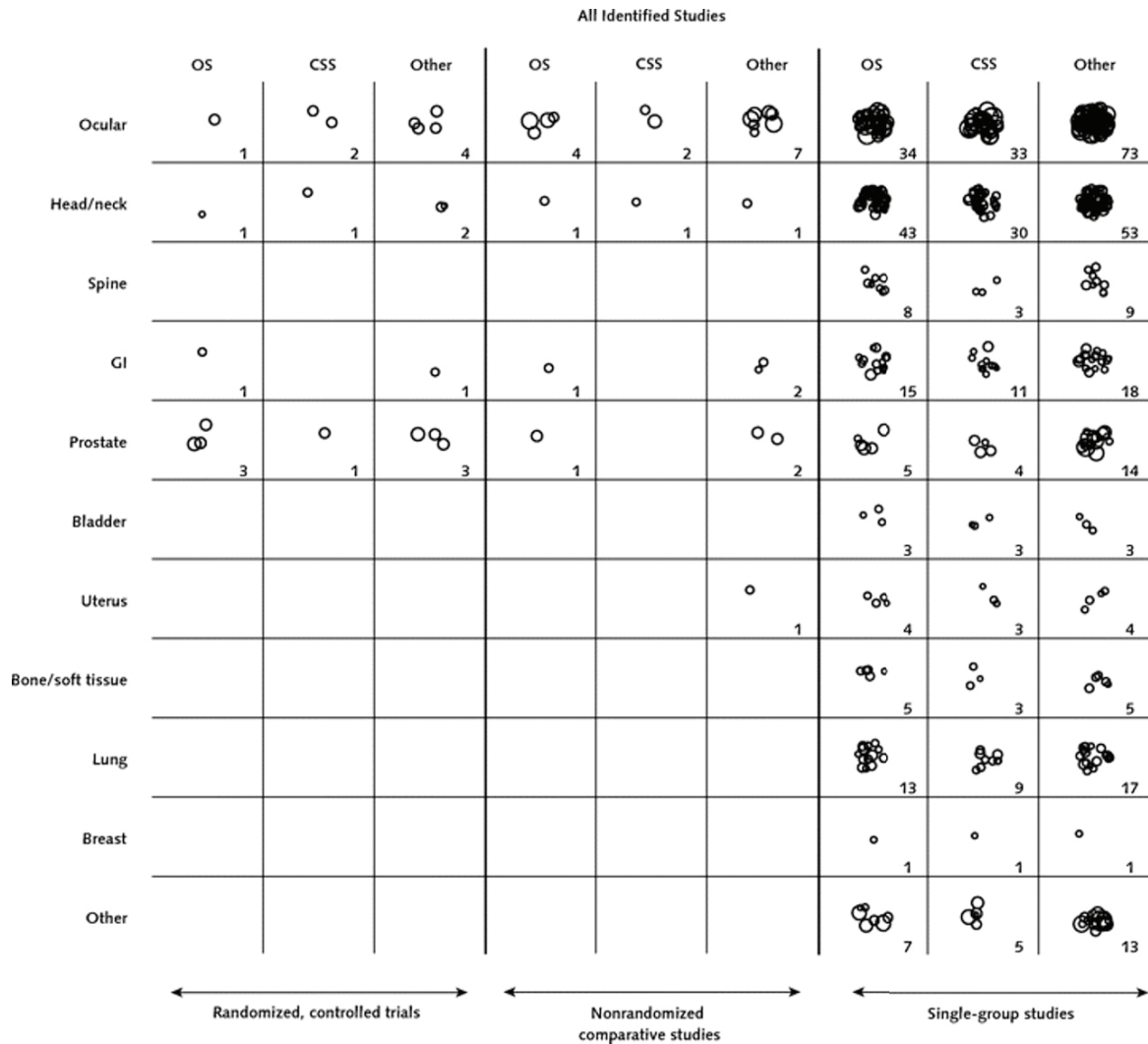


Figure 36 : Etat de l'Evidence Based Medicine en hadronthérapie en 2009, d'après (407)

Chaque cercle représente une étude. Sa taille est proportionnelle au logarithme du nombre de patients inclus; le chiffre dans chaque case indique le nombre d'études disponible pour chaque indication/objectif. OS: survie globale, CSS : survie spécifique au cancer, other : autre objectif étudié.

En février 2002, le consortium européen ENLIGHT (*European Network for LIGHT ion Hadron Therapy*) a été constitué en ce sens fédérant les universités et les centres européens impliqués dans la thématique (427). ULICE en particulier vise à organiser, coordonner et disséminer les initiatives de soins et de recherche en hadronthérapie par ions carbone via le développement de concepts et d'outils communs.

1.2. Recherche de nouveaux biomarqueurs de radiosensibilité individuelle

Dans le troisième cas, une connaissance a priori de la radiosensibilité individuelle devrait permettre à l'avenir de délivrer une irradiation plus personnalisée.

Le sujet de thèse développé dans le présent manuscrit s'est ainsi naturellement imposé à nous puisqu'il s'agit d'explorer les possibilités d'optimiser la tolérance à la RT et donc d'améliorer secondairement l'index thérapeutique et l'efficacité de ce traitement. Notre équipe d'accueil a fourni des résultats préliminaires sur les effets du TEL sur la radiosensibilité de lignées humaines représentatives de tissus sains du système nerveux central. Ces données (non publiées) permettent d'apporter des connaissances intéressantes sur la tolérance de l'hadronthérapie.

Nous avons pu, dans ce travail, combiner une approche biologique *a priori*, consistant à mieux connaître la radiosensibilité d'un patient, à une approche physique et stratégique elle aussi *a priori* visant à choisir la carbone thérapie pour un patient donné. Bien entendu ces deux approches sont traitées selon des aspects spécifiques et ne prétendent en rien solutionner toutes les questions d'indications thérapeutiques et du choix des patients. Néanmoins il existe une réelle cohérence conceptuelle à contribuer au mouvement tant revendiqué de « personnalisation » des traitements en cancérologie en adoptant le point de vue de l'optimisation de la toxicité de la RT par deux approches différentes parmi de nombreuses autres (Figure 37).

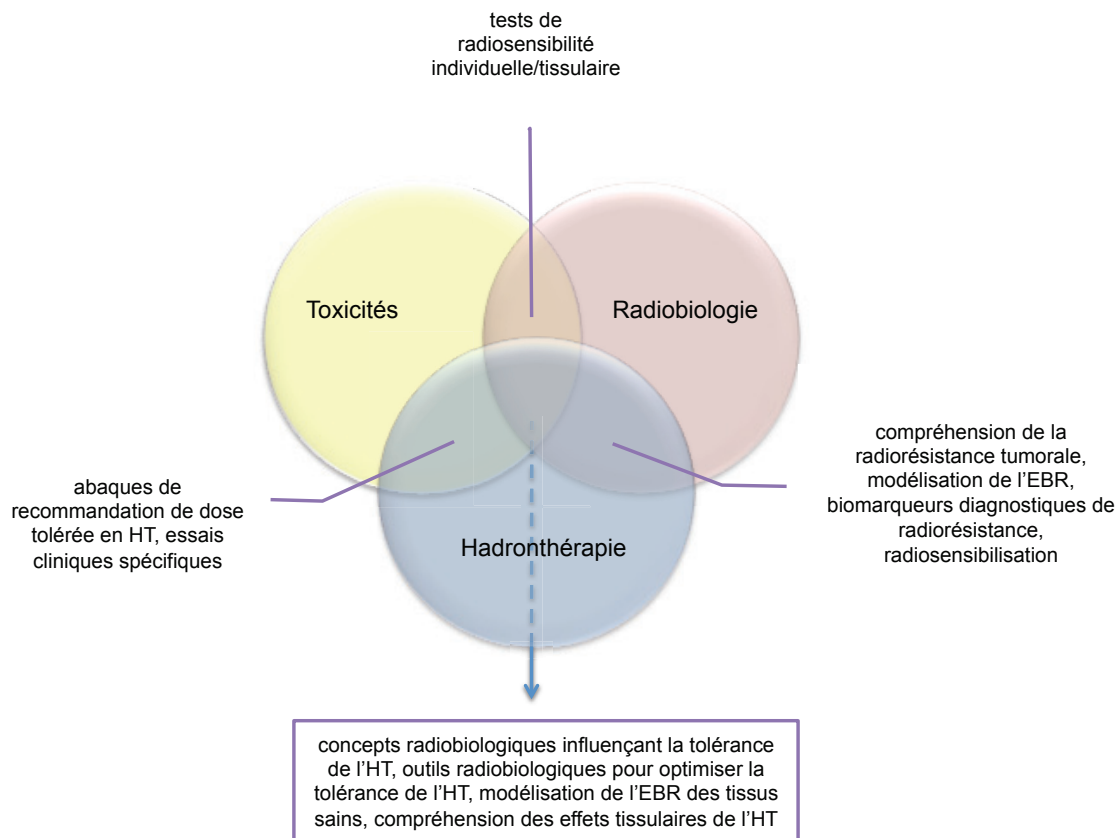


Figure 37: Vision personnalisée de l'intersection des thématiques rapportées dans la thèse permettant d'en soulever des objectifs originaux.

2. Objectifs de la thèse

2.1. Programme ULICE

ULICE est un projet de 5 ans financé par l'Union Européenne dans le cadre du 7^{ème} programme cadre de recherche et développement (7^{ème} PCRD ou FP7) et mis en place en 2009 par 20 grands organismes de recherche européens, dont les deux principaux partenaires industriels européens (Siemens et IBA). Ce programme visait à faciliter l'accès aux centres d'hadronthérapie par ions carbone à des fins de recherche et de soin. Il était construit autour de 3 "piliers" :

- *joint research activities* (JRA) : développement de concepts, procédures et outils communs autour des problématiques diverses illustrées dans la figure 38 : identification des paramètres influençant le résultat du traitement, harmonisation des concepts utilisés

dans la prescription du traitement et élaboration d'un socle de procédures permettant d'harmoniser les pratiques au sein des centres actifs et à venir, méthode permettant de faire coïncider le volume cible avec le volume traité en technique active, outils de mesure, compensation et prédiction de la mobilité des organes afin de développer l'hadronthérapie 4D, instruments de planification adaptative répondant à l'hétérogénéité et la dynamique évolutive des tumeurs en cours de traitement, outil de sélection des patients éligibles sur des critères radiobiologiques individuels, mise au point de gantry pour optimiser davantage la distribution de dose, développement d'une plateforme partagée et sécurisée permettant d'échanger des données cliniques, biologiques, physiques ou iconographiques, développement d'outils sémantiques normalisés et d'un registre de métadonnées afin que les paramètres recueillis dans les essais cliniques soient utilisés de manière cohérente et interopérable

- *networking activities (NA)* : facilitation de la coopération entre les centres, rationalisation du développement de nouveaux centres, partage des ressources, actions de formation communes, mise en place d'une infrastructure de recherche translationnelle et clinique centralisée

- *transnational access (TA)* : mise à disposition de temps de faisceaux pour des projets de recherche collaboratif, promotion de projets de recherche fondamentale, translationnelle ou clinique, coopératifs construits à partir des concepts et outils standardisés précédemment développés et délégation de temps de faisceau pour traiter les patients inclus au sein des deux centres actifs ; partage des données

Les deux centres européens de recherche et de traitement existant à Heidelberg (Allemagne) et Pavie (Italie) ainsi que les centres planifiés ont été partenaires, les premiers fournissant notamment du temps de faisceau.

Comme tous les programme de recherche collaboratifs, des groupes de tâches ont été définis (working packages, WP) et la coordination confiée à différents chercheurs membres des équipes regroupées dans ULICE. L'Université de Lyon a participé à plusieurs WP dont le WP2 coordonné par les Prs Ramona Mayer (MedAustron, Autriche) et Jacques Balosso (Centre ETOILE, Lyon, France). Nous avons donc activement collaboré au WP2 sous la supervision du Pr Balosso mais aussi à quelques autres WP selon nos compétences.

Le WP2 prévoyait plus spécifiquement, l'harmonisation des concepts et des pratiques de recherche médicale, et nous devions participer à des groupes de travail et établir ces concepts unifiés, ainsi que des outils et des recommandations pratiques dans les thématiques qui nous ont été confiées, à savoir:

- prescription de doses iso efficaces dans des volumes spécifiques, en abordant les problématiques de la technologie de production des faisceaux, des organes en mouvement, des modifications de fractionnement, de l'efficacité biologique relative (WP2)
- modalités de communication des résultats et des comptes-rendus de traitement (WP2)
- conception d'essais cliniques collaboratifs et développement d'outils d'analyse de métadonnées (WP7 & 11)
- rationnel économique d'implantation de nouveaux centres (WP9)
- pratiques d'immobilisation (WP10)
- fédération et structuration de la recherche clinique sur le plan européen (WP2 & 11)

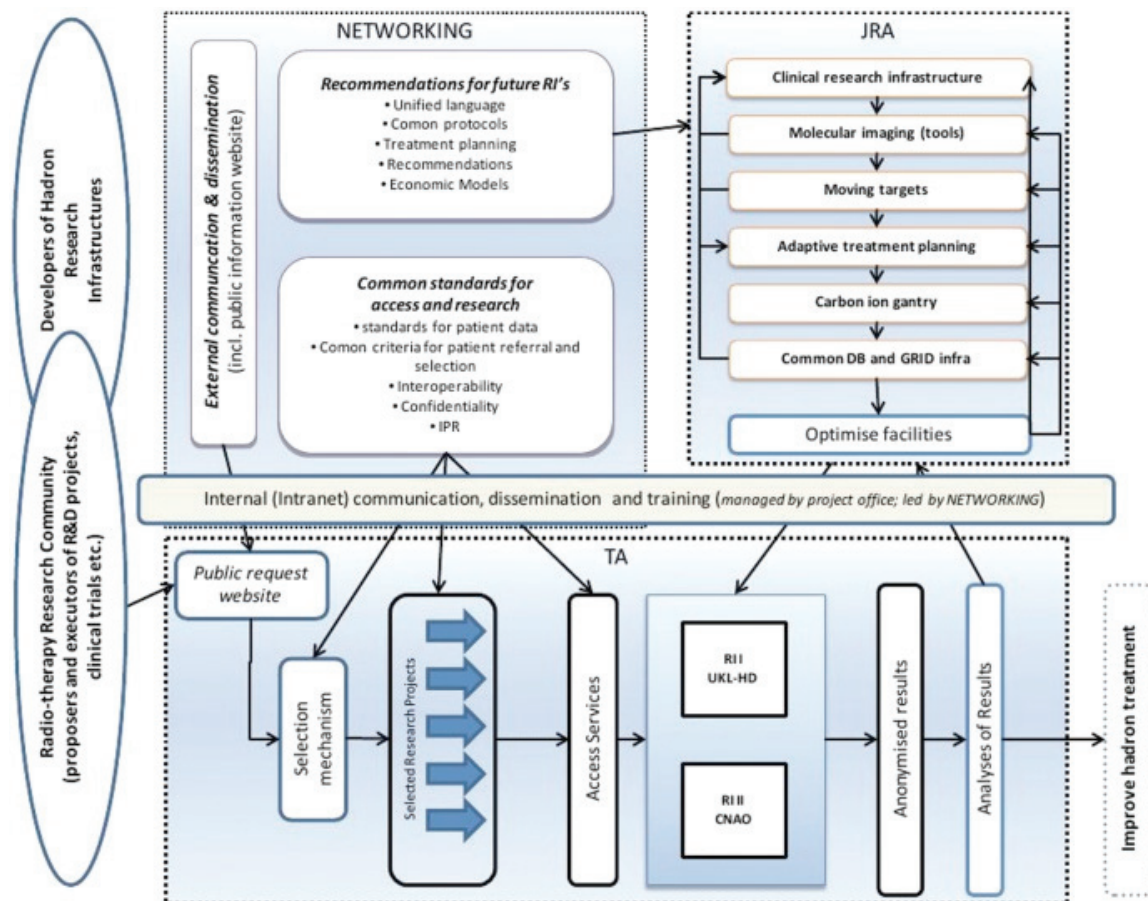


Figure 38 : Organisation et thématiques du projet ULICE

2.2. Recherche de nouveaux biomarqueurs de radiosensibilité individuelle

Au démarrage de la thèse, l'équipe d'accueil avait pu décrire la distribution de la radiosensibilité en 3 groupes selon le taux de CDB non réparées à 24h. Toutefois avec l'expansion de la collection de lignées de patients radiosensibles, ce modèle devait être amélioré en rapportant par ailleurs les foci pATM suggérant un transit cyto-nucléaire de la protéine après irradiation. Cette hypothèse est notamment renforcée d'une part par l'authentification de pathologies héréditaires associées à une hyper radiosensibilité sans aucune altération structurelle ou fonctionnelle de protéines de réparation, d'autre part par l'effet du traitement combinant inhibiteur de farnésyl transférase + biphosphonate qui semble accélérer le transit d'ATM (424).

L'objectif de notre travail était de démontrer l'influence du transit cyto-nucléaire d'ATM sur la radiosensibilité individuelle. Nous avons sélectionné six lignées selon leur groupe de radiosensibilité défini précédemment (I, II, III) et le nombre de foci pATM à 10 minutes. Nous avons ainsi développé un protocole original de fractionnement cellulaire et une procédure de quantification protéique par western blots.

Une fois ce concept démontré, nous avons entrepris d'évaluer la spécificité tissulaire du transit cyto-nucléaire d'ATM et l'existence éventuelle d'un lien avec la variabilité inter tissulaire de la réponse radio induite, bien connue des radiothérapeutes et appliquée chaque jour lors des prescriptions, et demeurant inexplicite sur le plan mécanistique (Figure 39). Nous avons ainsi développé une étude transversale prospective pilote au cours de laquelle nous avons collecté 5 types cellulaires du microenvironnement mammaire chez des patientes opérées pour cancer du sein. En parallèle nous avons suivi leur tolérance précoce à la RT (étude PREVIRAS). Cette étude nous a conduit à développer des méthodes de culture cellulaire spécialisées. Les résultats seront présentés à l'oral.

Enfin nous avons significativement enrichi la collection COPERNIC grâce à notre activité médicale publique (Centre Léon Bérard, Institut de Cancérologie de Lorraine, CHR Metz-Thionville, Centre Hospitalier Emile Durkheim d'Épinal) et de remplacement libéral (Annecy, Lyon, Grenoble, Châlons-sur-Saône) durant la période de thèse. L'histoire médicale de l'ensemble des patients inclus dans COPERNIC a été reprise afin de quantifier précisément les toxicités selon l'échelle CTCAE v4.0 et les échelles de morbidité du RTOG.

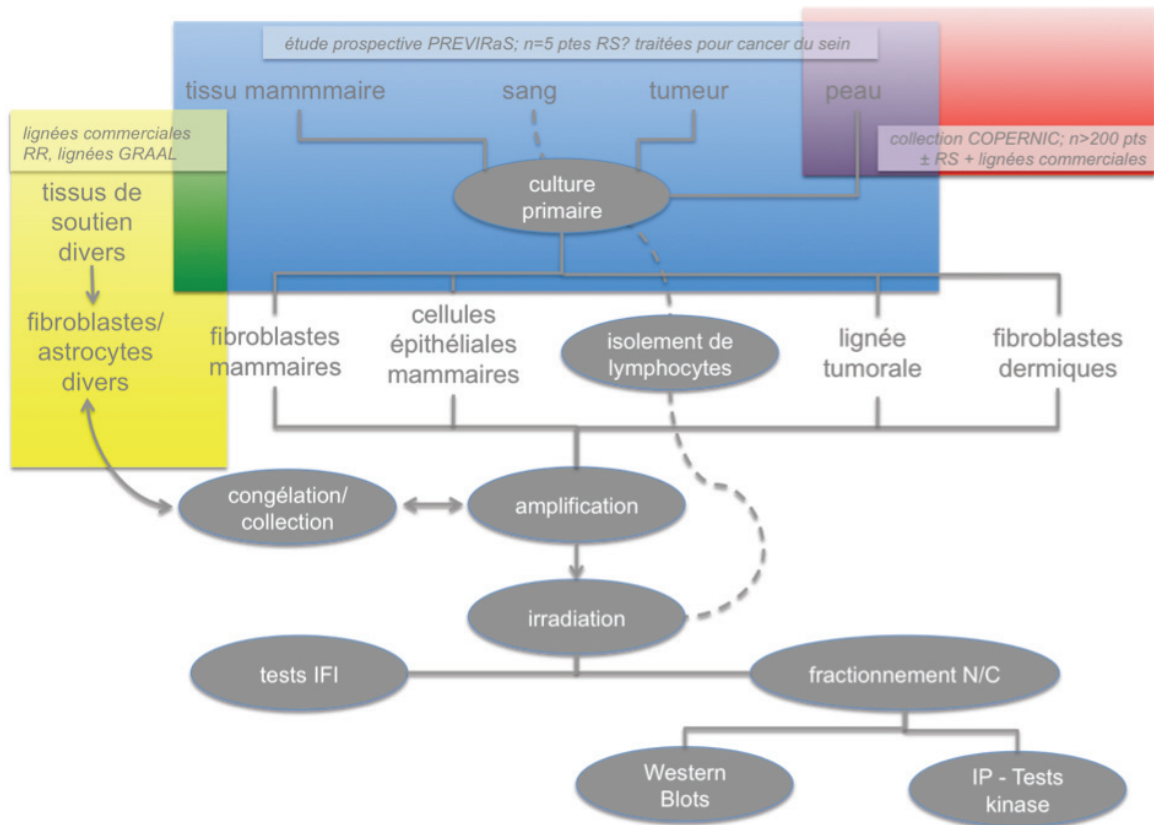


Figure 39 : Schéma expérimental global de la partie biologique de la thèse

Matériels et Méthodes

1. Programme ULICE

Nous avons intégré le consortium ULICE à compter de mai 2010 et jusqu'à son aboutissement (juillet 2014) en qualité de coordonnateur opérationnel pour les WP2, 7, 9, 10 & 11, sous la direction du Pr Balosso et pour le compte de la participation de l'Université de Lyon (UCBL). Cette participation est mentionnée dans les rapports d'activité du PRRH.

Un contrat d'objectif a été établi avec l'UCBL. Nous devons fournir et justifier du temps de travail comptabilisé en Hommes*Mois (1 H.M = travail temps plein = 134 heures) Ce temps de travail devait quantifier les diverses activités produites dans le cadre de ce programme : réunions de coordination locale, travail personnel de réflexion et production des livrables soumises à la Commission Européenne, réunions de groupe de travail, restitution en réunion de projet annuelle, production scientifique. Les concepts, outils et recommandations développés au sein des groupes de travail étaient alors soumis au public d'intérêt sous forme de livrables et selon un calendrier précis et une utilisation raisonnée des ressources humaines. L'ensemble des livrables était au préalable revu par le coordonnateur du pilier concerné, puis le chef de projet et enfin des experts de la Commission européenne. Une évaluation globale du projet a eu lieu à mi-parcours en 2012 puis en fin de programme.

Sur le plan individuel, les feuilles de temps devaient être complétées à la fin de chaque mois avec description du travail accompli. Ces feuilles de temps étaient ensuite validées par le responsable universitaire (Pr Jean-Michel Moreau) puis par le gestionnaire de l'UCBL. 20,75 H.M ont ainsi été déclarées par nos soins correspondant à 2779 heures de travail effectif (Tableau 22).

Mon implication dans le projet ULICE s'est concrétisée à mi-temps la première année et à quart-temps les trois années suivantes, coïncidant avec la reprise de mon activité clinique à l'Institut de cancérologie de Lorraine. De manière plus précise, nous avons pu:

- réaliser une recherche bibliographique exhaustive

- coordonner les chercheurs et cliniciens impliqués dans le PRRH (Programme Régional de Recherche en Hadronthérapie)
- définir un plan de travail intégré pour l'ensemble des chercheurs de l'UCBL impliqués, et en respectant le calendrier imposé par l'UE et les hommes-mois à déclarer
- intégrer les groupes de travail multinationaux et participer aux discussions durant des réunions organisées dans diverses institutions européennes. Citons notamment la collaboration initiée avec les programmeurs de l'université d'Oxford en juillet 2011 dans le cadre du WP7.
- mettre au point un questionnaire pour réaliser une enquête sur les procédures d'immobilisation dans les principaux centres internationaux
- exploiter les résultats de ce questionnaire et établir des recommandations éclairées
- organiser, animer ou participer à des réunions de travail à Lyon et à l'étranger (Oxford, Vienne, Pavie, Marburg...)
- corédiger les livrables
- exposer les résultats devant la communauté européenne au cours des réunions annuelles
- rédiger un article synthétisant notre démarche et nos résultats obtenus dans le WP2
- corédiger le premier essai multicentrique international en carbone thérapie. Il s'agit d'une étude prospective, comparative randomisée de la RT par ions carbone concernant des patients porteurs d'un cancer localisé, inopérable (ou en résection R2) et radio résistant (chordomes du squelette axial crâne exclu, carcinomes adénoïdes kystiques de la tête et du cou et certains sarcomes), avec comparaison des résultats de la carbone thérapie (réalisée hors de France) et des modalités alternatives de RT (réalisées en France)
- Ce protocole a pu ensuite servir de banc d'essai pour l'implémentation des procédures unifiées mises au point dans le cadre d'ULICE (e-CRF avec métadonnées en lien avec le WP7, définition des doses/volumes et structuration protocolaire en lien avec le WP2, procédure réglementaire et évaluation centralisée en lien avec le WP11...)

- En ce sens, nous avons pu adopter une démarche transversale entre les différents groupes de travail dans lesquels nous étions impliqué (entre WP2 et WP11; entre WP2 et WP7; entre WP2 et WP10)

ULICE		WP2	Clinical research infrastructure coord: J.Balosso et R. Mayer
<i>Hommes-mois déclarés</i>	<i>dead line</i>	<i>description</i>	
Concepts and terms for dose volume parameters and for outcome assessment in Hadron-therapy integrating applied biology, medical physics and clinical medicine in ULICE.			
2,7	Février 2011	DJRA 2.1 Harmonization of concepts and terms for volume and dose parameters in photon, proton and carbon-ion therapy	
2,5	Août 2012	DJRA 2.5 Harmonization and recommendations for prescribing and reporting absorbed doses and dose-volume histogram's based on 3D and 4D concepts	
1,5	Août 2012	DJRA 2.7 Document on joint outcome assessment: disease control, recurrence assessment, Quality of Life	
2,75	Août 2014	DJRA 2.9 Part 1: integrated concept of 3D/4D absorbed dose and variations in biological effects with RBE, fractionation, overall time	
Design and implementation of a clinical research infrastructure in ULICE			
0,5	Février 2011	DJRA 2.3 Description of tasks with a proposal for potential structures for clinical research in ULICE	
ULICE		WP7	Common database and grid infrastructures for improving and catalysing access to RI for the broad European community coord: Bleddyn Jones (UOXF)
2,8	Décembre 2010	DJRA 7.3 Prototypical services that allow a clinician to locate case histories, to view summary information, and to request detailed information in support of treatment planning	
ULICE		WP9	Recommendations for further improvement and investment of the current and future hadron research infrastructures coord: Piero Fossati (CNAO)
Development of tools and criteria for an objective evaluation of the impact on public health of a new hadron therapy facility			
1,25	Février 2011	DNA 9.1 Report on scientific and technical aspects of the existing and planned infrastructures, on demographic and geographic aspects of the European facility distribution and on clinical criteria of eligibility for Hadron-therapy	
ULICE		WP10	Development and spreading of Europe-wide common protocols standardizing operational procedures to facilitate access to hadron therapy facility and intercomparison of results coord: Roberto Orecchia (CNAO)
Collation & comparison of protocols for defining & optimizing for future Europe wide use			
1,25	Février 2011	DNA 10.3 Written protocols standardizing features of the active facility	
2	Février 2013	DNA 10.5 ULICE website with standardized protocols	
ULICE		WP11	Implementation of transnational access coord: Jürgen Debus (UKL-HD)
11.4 Implementation and coordination of clinical trials at running facilities			
2	Août 2011	TA 11.8 Dedicated space on the ULICE web site for clinical access	
11.5 Comprehensive Europe-wide scientific review committee and consensus group			
1,5	Août 2011	TA 11.11 Generation and Implementation of Clinical Trial II	
20,75	TOTAL		

Tableau 22 : Calendrier de remise des livrables dans la rédaction desquelles nous avons été impliqué.

2. Recherche de nouveaux biomarqueurs de radiosensibilité individuelle

2.1. Critères d'inclusion et déroulement de l'étude COPERNIC

Il s'agissait de collecter auprès des oncologues radiothérapeutes et oncopédiatres français les patients ayant présenté une réaction tissulaire inhabituelle, précoce ou tardive, à une RT. Une réaction est inhabituelle lorsqu'elle survient de façon significativement plus précoce ou plus sévère qu'attendu – et ceci en l'absence de déviation thérapeutique (17).

En parallèle, les enfants présentant un syndrome malformatif laissant craindre une réparatose ont également été inclus prospectivement. Les patients présentant un nouveau cancer en bordure de champ d'une RT passée, et donc suspects de cancer radio induit, ont également été inclus.

L'oncologue en charge du patient devait, après recueil du consentement éclairé du patient, renseigner un CRF (annexe 3.1) recensant la dosimétrie, la description de la réaction clinique et sa gradation, ainsi que les potentiels facteurs de confusion de radiosensibilité (âge, tabagisme, hémoglobinémie, médications, diabète, maladie génétique ou auto-immune, volume traité, complications chirurgicales...)

Ces patients se sont vus proposer une biopsie cutanée visant à produire une lignée primaire fibroblastique individuelle sur laquelle ont été réalisés, avant/après irradiation deux séries indépendantes de tests radiobiologiques par immunofluorescence indirecte.

Un rapport de diagnostic était remis à l'oncologue.

2.2. Cotation des toxicités

Toutes les toxicités, précoces et tardives sont cotées selon l'échelle CTCAE v 4.0.

2.3. Anticorps

Pour l'ensemble des manipulations, les anticorps suivants sont utilisés :

- Ac primaire anti-pH2AX (Ser139), clone JBW301: Millipore® (# catalogue 05-636)
- Ac primaire anti pATM (Ser 1981), clone 10H11.E12; Millipore® (# catalogue 05-740) Cet anticorps reconnaît pATM, PM ~370 kDa. Une protéine non spécifique de PM>400 kDa est également détectée.
- Ac primaire anti ATM total, clone 2C1, Abcam® (# catalogue ab78)
- Ac primaire anti MRE11 clone 12D7; QED Bioscience® (# catalogue 56211)
- Ac secondaire anti IgG souris polyclonal (molécule entière, marqué FITC); Sigma® (# catalogue F2012)

2.4. Prélèvements dermiques chez les patients

Le prélèvement est réalisé de préférence à la face interne du bras, au tiers supérieur, entre le pli du coude et le creux de l'aisselle, dans des conditions de stérilité strictes. La peau doit être nettoyée à la chlorhexidine ou l'alcool, à l'exclusion de tout autre antiseptique.

Une anesthésie locale à la pommade EMLA est souhaitable ; elle est très efficace

La biopsie s'effectue de préférence à l'aide d'un dermatome (ou « punch ») de 2 mm de section.

Immédiatement après le prélèvement, le fragment biopsique est placé dans un tube ou poudrier stérile (flacon ECBU à bouchon rouge) dans du milieu de culture (HAM, RPMI ou DMEM) ou du NaCl 9‰ injectable à température ambiante ; transporté dès que possible dans des conditions assurant la

protection contre les chocs mécaniques et thermiques (protection par plastique à bulles et emballage résistant).

L'expédition doit être immédiate et permettre la livraison du prélèvement au Centre de Biotechnologie Cellulaire dans un délai maximal de 48 heures dans les conditions de transport de matériel biologique. Le transport s'effectue à température ambiante.

2.5. Prélèvements dans le cadre de l'étude PREVIRaS

Le jour de la mastectomie partielle programmée à l'ICL, 5 mL de sang veineux sont prélevés en secteur dans un tube EDTA

La pièce de mastectomie partielle arrive au labo d'anatomie pathologique de l'ICL; de cette dernière l'anatomo-pathologiste ou le technicien échantillonne :

- une biopsie de peau d'au moins 2mm de diamètre comportant le derme. Cette biopsie sera placée dans un flacon stérile type ECBU (volume 60 mL) et contenant environ 40 mL de DMEM complétement (20% SVF + 1% péni-strepto) dans des conditions d'asepsie.
- une biopsie de tumeur d'au moins 2 mm. Cette biopsie sera placée dans un flacon stérile type ECBU (volume 60 mL) et contenant environ 40 mL DMEM complétement dans des conditions d'asepsie.
- une biopsie de glande mammaire saine en périphérie de la tumeur d'au moins 4 mm; Un contrôle qualité s'avère indispensable : l'absence de cellules tumorales et la présence de cellules épithéliales mammaires devront être vérifiées en microscopie par examen extemporané de fragments tissulaires prélevés en miroir. Cette biopsie sera placée dans un flacon stérile type ECBU (volume 60 mL) et contenant environ 40 mL de milieu MEpiCM, dans des conditions d'asepsie.

L'ensemble des échantillons (sang, tumeur, peau, tissu mammaire sain) est centralisé par l'ARC et expédié à température ambiante, le jour même, par transporteur spécialisé aux équipes lyonnaises.

2.6. Culture primaire des fibroblastes dermiques depuis la biopsie de peau

2.6.1. *Mise en culture primaire*

Les opérations suivantes s'effectuent sous hotte à flux laminaire

- Remplir 2 flacons T25 avec 1,5 mL de milieu M4, les agiter pour que le milieu couvre le fond et les laisser à plat. Mettre une goutte de milieu dans la boîte de pétri.
- Transvaser le contenu du récipient de transport dans le fond de la boîte puis récupérer la biopsie ou prélever directement celle ci. La placer dans le couvercle de la boîte de pétri.
- A l'aide de 2 lames de scalpel, éliminer si nécessaire les couches de derme profond et de tissu adipeux,
- Découper le tissu en très petits fragments (= 1/4 tête épingle).
- Prélever (1 mL) du milieu d'un flacon T25, et le déposer sur les fragments biopsiques découpés.
- Suspendre ces fragments tissulaires dans le milieu. Les aspirer sans atteindre le renflement de la pipette pasteur et les ensemercer dans le flacon T25 (mettre si possible 10 fragments tissulaires par flacon). En rejetant le mélange milieu + fragments, s'assurer de la bonne dispersion de ceux-ci. Refermer le flacon. Refaire cette manœuvre avec le deuxième flacon puis la boîte de Pétri (mettre 2-3 fragments seulement).
- Recouvrir les fragments présents dans la boîte de Pétri, d'une lamelle de verre stérile (lamelle couvre objet) ou stérilisée (si nécessaire (lamelle non stérile), à l'aide du vide et d'une pipette pasteur non cotonnée.
- Compléter à 2 mL de milieu en évitant de faire flotter la lamelle.
- Nettoyer à l'alcool iodé une grande boîte de rangement en plastique.
- Placer les deux flacons T25 et la boîte de Pétri dans la boîte de rangement et placer le tout délicatement dans l'incubateur de culture primaire de fibroblastes

2.6.2. Suivi de la culture

- Après 3 ou 4 jours de culture, rajouter délicatement, goutte à goutte, 1 mL de milieu M4, sans décoller les explants, dans chacun des flacons.
- Après 1 semaine de culture observer la croissance cellulaire au microscope et changer le milieu de culture M1 deux fois par semaine.

2.7. Isolement des lymphocytes depuis le prélèvement sanguin

Sous la hotte :

- verser dans un tube conique de 50 mL le volume total de sang + un volume équivalent de PBS 1X (= tube 1)
- verser dans un second tube conique de 50 mL un volume de ficoll équivalent au volume du tube 1 (= tube 2)
- Verser délicatement le contenu du tube 1 dans le tube 2 afin d'obtenir deux phases.
- Centrifuger 1 heure à 20°C avec des phases d'accélération de 20 min (1000 rpm)
- 4 phases doivent se distinguer dont une constituée d'un anneau blanc contenant les lymphocytes.
- Aspirer délicatement sous la hotte cet anneau et le restituer dans un tube conique de 50 mL.
- Selon le volume récupéré, ajouter le même volume de PBS.
- Centrifuger ce tube à 1500 rpm, température ambiante, 10 minutes
- Lavage : éliminer le surnageant et ajouter à nouveau 5 à 10 mL de PBS 1X et re centrifuger à 1500 rpm 5 à 10 minutes
- Eliminer de nouveau le surnageant et resuspendre dans du milieu RPMI 20% SVF + 1 % PS selon volume manip

Le volume de lymphocytes dans le milieu de culture sera réparti ainsi pour les manipulations d'immunofluorescence :

condition	marqueur testé			volume utile
0 Gy	γ H2AX	pATM	MRE11	3 mL
2 Gy, 10 min	γ H2AX	pATM		2 mL
2 Gy, 1 h	γ H2AX	pATM		3mL
2 Gy, 4 h	γ H2AX		MRE11	2mL
2 Gy, 24 h	γ H2AX			1mL

2.8. Culture primaire des fibroblastes mammaires depuis la biopsie de tissu péri-tumoral

Les opérations suivantes s'effectuent sous hotte à flux laminaire : S4-P1-I4 Travail sous hotte à flux laminaire

2.8.1. Mise en culture primaire

- Marquer le numéro d'enregistrement de la souche (W....GM01 F), le code d'anonymisation PREVIRAS ainsi que la date sur 2 flacons T25.
- Remplir 2 flacons T25 avec environ 1,5 ml de milieu CHANG SANS FUNGIZONE, les agiter pour que le milieu couvre le fond et les laisser à plat.
- Déposer dans le couvercle de l'autre boîte de pétri de 60mm, le morceau de biopsie de glande mammaire restant, ainsi que quelques gouttes de milieu CHANG SANS FUNGIZONE pour faciliter la découpe. A l'aide de 2 lames de scalpel stériles, éliminer si nécessaire le tissu adipeux, découper ensuite le tissu en très petits fragments (= 1/4 tête épingle).
- Prélever ensuite 1 mL du milieu d'un flacon T25, et le déposer sur les fragments biopsiques découpés.
- Suspendre ces fragments tissulaires dans le milieu. A l'aide d'une pipette pasteur cotonnée, aspirer les explants sans atteindre le renflement de la pipette pasteur et les ensemercer dans le

flacon T25 (mettre si possible 10 fragments tissulaires par flacon). En rejetant le mélange milieu + fragments, s'assurer de la bonne dispersion de ceux-ci. Refermer le flacon. Refaire cette manœuvre avec le deuxième flacon.

- Nettoyer à l'alcool iodé une grande boîte de rangement en plastique.
- Placer les deux flacons T25 dans la boîte de rangement, et placer le tout délicatement dans l'incubateur du box 5 (traitement des lymphoblastes).
- Ranger les fiches de cultures et tableaux de suivi dans le classeur vert des cultures sans fungizone.

2.8.2. Suivi de la culture

- Après 3 ou 4 jours de culture, rajouter délicatement, goutte à goutte, 1mL de milieu CHANG SANS FUNGIZONE, sans décoller les explants, dans chacun des flacons.
- Après 1 semaine de culture observer la croissance cellulaire au microscope et changer le milieu de culture deux fois par semaine avec du milieu pour culture primaire SANS FUNGIZONE.
- Lorsque les 2 flacons T25 atteignent 70% de confluence : Transmettre immédiatement les flacons au laboratoire INSERM CRU 1052.

Remarque importante: Incrire sur les fiches de culture et le tableau de suivi spécial glande mammaire, à chaque étape, l'identité du manipulateur, l'état de la culture, les opérations effectuées. Les caractéristiques des milieux utilisés sont également notées sur la fiche de culture (nature, date de fabrication ou numéro du milieu).

2.9. Culture primaire des cellules épithéliales mammaires depuis la biopsie de tissu péri-tumoral

Les opérations suivantes s'effectuent sous hotte à flux laminaire :S4-P1-I4 Travail sous hotte à flux laminaire

2.9.1. Mise en culture primaire

La mise en culture sera faite par deux techniciennes en simultané.

- Marquer le numéro d'enregistrement de la souche (W...GM01), le code d'anonymisation PREVIRAS ainsi que la date sur les plaques 6 puits.
- Numéroter les plaques de 1 à 4 (pour la première technicienne), et de A à D (pour la deuxième technicienne).
- Passer le flacon contenant la biopsie à l'alcool.
- Déposer dans le couvercle de la boîte de pétri de 60mm, la biopsie de glande mammaire, ainsi que quelques gouttes de milieu MEPiCM pour faciliter la découpe. A l'aide de 2 lames de scalpel stériles, éliminer si nécessaire le tissu adipeux, mettre à part une partie de la biopsie (pour la mise en culture pour obtention de fibroblastes (cf. 2.2)), découper ensuite le tissu en très petits fragments (= 1/4 tête épingle).
- Prélever ensuite environ 1 mL de milieu, et le déposer sur les fragments biopsiques découpés.
- Suspendre ces fragments tissulaires dans le milieu. A l'aide d'une pipette pasteur cotonnée, aspirer les explants sans atteindre le renflement de la pipette pasteur et déposer 1 explant par puits. Recouvrir ensuite chaque explant d'une lamelle stérile à l'aide du vide et d'une pipette pasteur non cotonnée. Enfin, mettre 2 mL de milieu MEPiCM + Compléments dans chaque puits, en évitant de faire flotter la lamelle.
- Nettoyer à l'alcool iodé une grande boîte de rangement en plastique.
- Placer les plaques dans la boîte de rangement et placer le tout délicatement dans l'incubateur du box 5 (traitement des lymphoblastes).

- Ranger les fiches de cultures et tableaux de suivi dans le classeur vert des cultures sans fungizone.

2.9.2. Suivi de la culture

Observation des cultures 3 fois par semaine : lundi - jeudi.

- Si on n'observe rien : Changement de milieu (aspiration du milieu existant à l'aide du vide et d'une pipette pasteur non cotonnée, puis ajout de 2mL de milieu MEPiCM neuf)
- Si apparition de cellules épithéliales : changement de milieu jusqu'à ce qu'il y ait une quantité suffisante de cellules.
Retourner délicatement la lamelle dans le puits d'une nouvelle plaque, à l'aide d'un scalpel et d'une aiguille stérile (noter LR sur tableau de suivi de culture). Ajouter 2mL de milieu dans le puits initial ainsi que dans le nouveau avec la lamelle.
Remettre ensuite l'explant en culture dans un nouveau puits avec une nouvelle lamelle stérile et 2mL de milieu (noter E dans tableau de suivi de culture). Continuer ensuite le planning normalement : on retourne les lamelles et remet les explants en culture jusqu'à ce qu'on ait une quantité de cellules satisfaisante.
- Si apparition de fibroblastes + cellules épithéliales : Retourner la lamelle dans le puits d'une nouvelle plaque afin d'essayer d'éliminer les fibroblastes. Continuer ensuite le planning normalement
- Si apparition de fibroblastes seulement : Continuer l'observation durant une semaine pour voir si des cellules épithéliales se développent. Si ce n'est pas le cas on élimine le puits (aspirer le milieu pour le mettre à sec et barrer le puits). Barrer la case correspondante sur le tableau de suivi.

Premier repiquage :

Le repiquage dans 1 flacon T25 nécessite 3 puits pleins de cellules (le collectionneur a besoin au minimum de 2 flacons T25) :

Lorsque que l'on a 3 puits initiaux pleins de cellules épithéliales dont les lamelles ont déjà été retournées => on repique en effectuant :

- 2 lavages à l'HBSS (environ 1mL pour chaque lavage).
- Puis on décolle les cellules grâce à de l'ACCUTASE diluée au 1/5^{ème} (incubation 10mn à 37°C). Si les cellules se décollent mal : gratter à l'aide d'un grattoir.
- Une fois les cellules décollées, les récupérer avec 2mL de milieu MECiPM
- Rassembler les 3 puits dans 1 tube de 15 ml
- Centrifuger le tube à 1500 tours/min pendant 5 min
- Aspirer le surnageant et reprendre avec 2 ml de milieu MEPiCM + complément
-
- Ensemencer dans 1 flacon T25.
- Ajouter 2ml de milieu dans celui-ci pour atteindre le volume final nécessaire de 4mL.

Suivi après le premier repiquage :

Continuer à observer les flacons T25 deux fois par semaine en même temps que les plaques restantes. Changer de milieu à chaque planning. Lorsque les cellules atteignent 70% de confluence : transmettre 2 flacons T25 immédiatement au laboratoire INSERM.

2.10. Culture primaire des cellules tumorales depuis la biopsie tumorale

- Réception du tube contenant la biopsie dans du milieu DMEM + 20% SVF + 1% P/S
- Verser le tout dans une grande boîte de pétri afin de pouvoir disséquer la biopsie en morceaux d'environ 1 à 2 mm à l'aide de deux lames de scalpel.

- Mettre environ trois à quatre morceaux de biopsie dans des boîtes de pétri de 5 cm de diamètre en y rajoutant 2 mL de DMEM + 20% SVF + 1% P/S (les morceaux de biopsie ne doivent pas flotter afin qu'ils puissent adhérer à la surface de la boîte).
- Changer le milieu de culture tous les 2 jours (2 mL pour les trois premiers changements, 4 à 5 mL ensuite) en surveillant l'apparition des premières cellules autour des morceaux de biopsie. Trois boîtes de pétri doivent être à confluence avant la première trypsination (enlever le milieu de culture, rincer avec 5mL de PBS 1X, mettre 1mL de trypsine 5min à 37°C, puis reprendre le tout dans un Falcon 15mL en douchant la boîte de pétri plusieurs fois avec 5mL de DMEM + 20% SVF + 1% P/S. Ensemencement dans une T25 avec 5 mL de DMEM + 20% SVF + 1% P/S).
- Amplifier la T25 en 2 T25 puis une T75

2.11. Amplification des lignées

- Aspirer le milieu de culture (DMEM pour fibroblastes)
- Rincer au PBS
- Ajouter X mL de Trypsine, laisser agir 5min à 37° C
- Ajouter 5 mL de milieu (DMEM pour fibroblastes, complété avec sérum de veau foetal et antibiotiques) pour stopper l'action de la trypsine prélever le contenu du flacon, le mettre dans un tube de 15mL
- Centrifuger le tube à 1100 rpm pendant 5 min
- Eliminer le surnageant
- Reprendre le culot de cellules avec Y mL de milieu (DMEM complété pour fibroblastes) et les remettre en suspension dans un flacon de culture

	T25	T75	T175
Volume X	1 mL	3 mL	5 mL
Volume Y qsp.	5 mL	12 mL	17 mL

- Flasque T75 pleine → 2T75
- Flasque T75 pleine → 1T75 plus une manip (5 boîtes avec 3 lamelles)
- Flasque T75 pleine → 1T75 plus une ampoule (10% DMSO, 90% solution cellulaire + milieu complété)

2.12. Archivage des lignées

- Aspirer le milieu de culture (DMEM pour fibroblastes)
- Rincer au PBS
- Ajouter X mL de Trypsine, laisser agir 5min à 37° C
- Ajouter 5 mL de milieu (DMEM pour fibroblastes, complété avec sérum de veau foetal et antibiotiques) pour stopper l'action de la trypsine prélever le contenu du flacon, le mettre dans un tube de 15mL
- Centrifuger le tube à 1100 rpm pendant 5 min
- Eliminer le surnageant
- Reprendre le culot dans 3.6mL de milieu et répartir équitablement la suspension cellulaire dans 2 ampoules (1T75 = 2 ampoules).
- Ajouter 200µL de DMSO dans chaque ampoule
- Réfrigération progressive des ampoules dans un container Mr. Frosty™ à -80°C pendant au moins 24h.
- Archivage en azote liquide

2.13. Irradiation conventionnelle photons (à confluence et à 4°C)

Celle-ci est réalisée sur un accélérateur du Centre Léon Bérard.

- En vue des expériences d'immunofluorescence : Les fibroblastes du patient sont ensemencés 2 jours avant l'irradiation. Après rinçage PBS 1X, dissolution enzymatique (volume adéquat de trypsine selon la capacité de la flasque, incubation 5 min à 37°C) puis addition de milieu, centrifugation à 1000 rpm pendant 5 min; remise en suspension des cellules dans un volume

adéquat de milieu (compter 3 mL/boîte); les cellules sont alorsensemencées sur des lamelles stériles (12mm de diamètre) dans des boites de Pétri, 10 000 cellules/lamelles, 3 lamelles/boîte (½ T75 pour 15 lamelles). Après élimination du milieu usagé, un volume adéquat de milieu à 4°C est ajouté 1h avant l'irradiation.

- En vue des expériences de fractionnement cellulaire : Les fibroblastes du patient amplifiés dans des T175 (8 à 16 flasques par manipulation) et arrivés à confluence voient leur milieu remplacé 1h avant l'irradiation par du milieu frais à 4°C (20 mL/flasque).

Une dose unique de 2 Gy (photons de 6MV, débit 200 UM/min) est délivrée au moyen d'un accélérateur linéaire dans le département de RT du Centre Léon Bérard (Lyon). Les lamelles portant les cellules saines sont placées dans des boîtes de Pétri posées sur une plaque de plexiglas (1,5 cm d'épaisseur) qui repose sur la table de traitement. L'irradiation est effectuée dans milieu à 4°C en utilisant un champ postérieur unique (180°) de 40 x 40 cm, à 100 cm de la table. Des fibroblastes témoins non irradiés sont placés à température ambiante en parallèle.

NB: A 4°C, les processus biologiques sont "figés" et reprennent lorsque du milieu à 37°C est ajouté ce qui représente le point de départ des manipulations. Cet artifice vise à obtenir des points de temps post irradiation précis du temps de manutention entre le laboratoire et le département de RT (les cellules sont transportées dans une boite polystyrène avec des blocs de glace.)

2.14. Tests d'immunofluorescence indirecte

La procédure est détaillée dans les articles en annexe.

2.15. Séparation nucléo-cytoplasmique

2.15.1. *Matériel et réactifs*

Solutions nécessaires

DTT 1M
 EDTA 0,5M pH 8
 EGTA 0,5M pH 7.25
 Glycérol
 Hepes 1M pH 7,9
 KCl 1M
 KCl 3,5 M
 MgCl₂ 0,5M
 NP40
 Inhibiteurs protéases 25X (Roche™, ref : 11873580001)
 Inhibiteurs de phosphatases 25X (Roche™, réf 04906845001)

Tampons à préparer

- Tampon A (Vf=10mL)

solutions	Ci	Cf	V
Hepes pH 7,9	1 M	10 mM	100 µL
MgCl ₂	0,5 M	1,5 mM	30 µL
KCl	1 M	10 mM	100 µL
EDTA pH8	0,5 M	2 mM	40 µL
DTT	1 M	0,5 mM	5 µL
NP40		0,20%	20 µL
H ₂ O			9,7 mL

- Tampon de lavage = Tampon A sans NP40

- Tampon B (Vf=10mL)

solutions	Ci	Cf	V
Hepes pH 7,9	1 M	20 mM	200 µL
MgCl ₂	0,5 M	1,5 mM	30 µL
KCl	1 M	450 mM	4,5 mL
EDTA pH8	0,5 M	2 mM	40 µL
EGTA	0,5 M	2 mM	40 µl
DTT	1 M	0,5 mM	5 µL
Glycérol		25%	2,5 mL
H ₂ O			2,7 mL

- Tampon de lyse totale (Vf = 20mL)

Solutions	Ci	Cf	V
Tris pH 8	2 M	50 mM	500 µL
Glycerol		10%	2 mL
NaCl	4 M	150 mM	750 µL
EDTA pH 8	0,5 M	2 mM	80 µL
NP 40		0,20%	40 µL
H ₂ O			qsp 20 mL

- Tampon « isoHépès-isoKCl » (Vf = 10 mL)

Solutions	Ci	Cf	V
Hépès pH 7,9	1M	10 mM	100 µl
KCl	1M	225 mM	2,25 mL
H ₂ O			7,65 mL

- Tampon de migration (LaemmLi)

solutions/poudres	Cf (10X)	Vol/Poids	Cf (1X)
Tris	250 mM	60,6 g	25 mM
Glycine	1920 mM	288 g	192 mM
SDS 10%	1 %	200 mL	0,1 %
H ₂ O		QSP 2 Litres	

- Tampon de transfert

solutions/poudres	Cf (10x)	Vol/Poids	Cf (1x)
Tris	250 mM	60,6 g	25 mM
Glycine	1,92 M	288 g	192 mM
SDS 10%	0,1 %	20 mL	0,01 %
H ₂ O		QSP 2 Litres	

- Solution TBS

solutions/poudres	Cf (10x)	Vol/Poids	Cf (1x)
Tris	250 mM	150 g	25 mM
NaCl	1370 mM	400 g	137 mM
KCl	27 mM	10 g	2,7 mM
H ₂ O		QSP 5 Litres	

Ajouter tween 500 µL par litre de TBS dans la bouteille finale

- SB/DTT

Le SB 5X est préparé dans l'ordre du tableau, dans tube Falcon 50 mL :

solutions/poudres	Cf (5x)	Vol/Poids	Cf (1x)
Tris pH 6,8, 2M	312.5 mM	3.125 mL	62.5 mM
H ₂ O		QSP 20 mL(<9 mL)	
Glycerol	50 %	10 mL	10 %
SDS (MASQUE)	10 %	2 g	2 %
Bromophénol Blue*	300mg/mL	6 mg	60mg/mL

La solution finale est préparée à partir de SB 5X et de DTT 1M :

- 2 volumes SB 5X pour 1 volume DTT 1M (= 1,54g DTT + H₂O qsp 10 mL)
- Aliquoter et conserver à -20°C.

2.15.2. Préparation des cellules et fractionnement

- Au retour de l'irradiation, remplacer le milieu froid par du milieu à 37 °C (20 mL/flasque T175) et placer le tout dans l'incubateur (temps 0 de la cinétique)
- Au moment du point de temps d'intérêt (0 min, 10 min, 1h), les cellules sont rincées dans du PBS à 4°C (7 mL/flasque) puis subissent une dissolution mécanique (grattage du fond des flasques)
- Placer le contenu de deux T175 dans un tube conique de 15 mL.
- Centrifuger à 1300 rpm pendant 5 min toujours à 4°C
- Pendant ce temps remettre 10 mL de PBS 1X dans les flasques grattées auparavant, et re suspendre le culot après la centrifugation avec ces 10 mL. Deux rinçages distincts avec le produit de rinçage des deux T175.
- Sécher ensuite le culot parfaitement à l'aide de micropipette

4 à 8 culots frais issus de 8 à 16 T175 sont obtenus par lignée et utilisés ainsi :

- 2 ou 4 culot-témoins non irradiés pour la lyse toto cellulaire + pour le fractionnement N/C
- 1 ou 2 culot(s) obtenu(s) 10 minutes après une dose unique de 2 Gy pour le fractionnement N/C
- 1 ou 2 culot(s) obtenu(s) 1 heure après une dose unique de 2 Gy pour le fractionnement N/C

La procédure de fractionnement se réalise toujours à 4°C et sur culots frais afin d'éviter une surmortalité cellulaire liée à la congélation (authentifiée pendant les étapes de perfectionnement du protocole)

- Reprendre chaque culot cellulaire dans 5 volumes (généralement 400 à 500µL) de tampon A (tampon complété avec inhibiteur de protéases et phosphatases: préparation 25X 40µL/mL de tampon), dans des tubes 1,5mL "low binding" prérefroidis
- Incuber 15 min précisément dans la glace
- Centrifuger 5 min, 4000 G, 4°C
- Prélever le surnageant = **FRACTION CYTOPLASMIQUE (C)**

- Lavages du culot : avec le tampon de lavage (5 volumes de culot ou environ 500µl) en utilisant des cônes coupés en biais (pour ne pas dissocier ni aspirer le culot nucléaire) : un ou deux aller-retour avec pipette, pour décoller le culot du fond du tube.
- Centrifuger 5 min, 4000 G, 4°C
- Faire 2 lavages supplémentaires.
- Sécher le culot parfaitement, à l'aide d'une pointe effilée
- Reprendre le culot dans 2 volumes (100 à 200 µL) de tampon B (tampon complété avec inhibiteur de protéases : préparation 25X 40µL/mL de tampon)
- Incuber 1h dans la glace
- Centrifuger 13 000 G, 10 min, 4°C
- Prélever le surnageant = **FRACTION NUCLEAIRE (N)**

Pour réaliser une lyse toto-cellulaire :

- Reprendre le culot cellulaire dans 5 volumes (généralement 400 à 500µL) de tampon de lyse totale (tampon complété avec inhibiteur de protéases et phosphatases : préparation 25X 40µL/mL de tampon), dans des tubes 1,5mL "low binding" prérefroidis
- Laisser incuber 20 min dans la glace
- Centrifuger à 4°C 10 min à 13 000 rpm
- Prélever surnageant = **EXTRAIT PROTEIQUE TOTAL (T)**

2.15.3. Dosage des protéines dans les différents extraits

- Réaliser la gamme de BSA suivante : 0/0,5/1/2/4/8µg (concentration du BSA = 1µg/µl) : dans des tubes d' 1,5mL ou 2 mL ajouter la quantité de BSA désirée + 200 µL de Bradford + eau distillée qsp 1 mL

- Préparation des échantillons : pour chaque extrait cyto/nuc ou extrait total, verser dans des tubes d' 1mL : 200 µL Bradford + 2 µL échantillon à tester + H2O distillée qsp 1 mL; bien homogénéiser et garder au max à 4°C.
- Conserver le reste des échantillons dans la glace
- Dosage automatisé colorimétrique au spectrophotomètre préalablement étalonné via le "blanc" puis la gamme de BSA; la concentration des différents extraits est obtenue; il est utile à cette étape de commencer à remplir le tableau suivant (Figure 40):

date													
opérateur													
lipide													
		AVANT EQUILIBRATION EN SELS				EQUILIBRATION EN SELS		APRES EQUILIBRATION EN SELS		PREPARATION DES ECHANTILLONS A DEPOSER			
		V _{extrait} (µL)	[C] _{extrait} (µg/µL)	quantité _{extrait} (µg)	ratio C/N	V _{protéine} (µL)	[C] _{protéine} (µg/µL)	quantité _{échantillon} (µg) =>	V _{échantillon} (µL)	+ V _{blanc}	+ V _{protéine}		
0 Gytotal					N/A								
0 GyC						+ ___ µL KCl 3,5M							
2Gy _{30min} C						+ ___ µL KCl 3,5M							
2Gy _{3h} C						+ ___ µL KCl 3,5M							
0 GyN						+ ___ µL H2O							
2Gy _{30min} N						+ ___ µL H2O							
2Gy _{3h} N						+ ___ µL H2O							
↑													
ordre de dépôt des échantillons de gel													

Figure 40 : Feuille de donnée remplie pour chaque manipulation de fractionnement

2.16. Western blots

2.16.1. *Equilibration des extraits en tampon et en KCl en vue de la migration*

- A partir des concentrations données par l'automate, calculer la quantité (µg) des protéines dans chaque extrait
- Equilibrer en KCl les extraits N et C:

	Ajouter	Concentrations finales	
N	+ 1 vol H2O	Hépès	10 mM
		KCl	225 mM
C	+ 1/15 vol KCl 3,5M	Hépès	9,4 mM
		KCl	220 mM

- Calculer alors les nouvelles concentrations en protéines des lysats N et C équilibrés

2.16.2. *Calcul des quantités d'échantillons à déposer sur gel*

Une quantité fixe sera déposée pour chaque compartiment (T, N, C). Cette quantité est dérivée de l'échantillon ayant la plus faible concentration protéique.

- Prélever les volumes de lysats N et C à déposer
- Ajouter du SB-DTT (30% du vol final de dépôt)

- Compléter avec un tampon « isoHépès-isoKCl » (Hépès 10 mM-KCl 225 mM) pour ajuster les volumes des échantillons.

2.16.3. Dépôt et migration des échantillons

- Dans des cuves de migration, insérer les plaques de gel gradient 4-15% préparées et montées sur leur portique, les submerger de tampon de migration 1X.
- Dénaturer les échantillons 4 minutes à 95 °C
- Centrifugation courte à 10 000 rpm
- Déposer les échantillons ainsi que le marqueur (réf : Page Ruler plus® : 5µl dans puits #1 et 10) à l'aide de cônes d'une P200 en respectant l'ordre de chargement du tableau de calcul (puits #2 à #9)
- Migration à 140 V. Arrêter dès que le bleu sort du gel.
- Pendant ce temps conditionner les échantillons résiduels après équilibration et adjonction d'1/3 de volume de SB-DTT (« bleu ») ; dénaturation à 95°C, 4 min puis congélation -80°C pour dépôt ultérieur (bien noter la date).
- Une fois la migration achevée, démonter le système, recycler le tampon, libérer et façonner les gels en prenant garde à leur sens de lecture

2.16.4. Transfert sur membrane

- Préparer et annoter la membrane de cellulose
- La baigner successivement dans :
 - o Bain éthanol
 - o Bain H₂O
 - o Bain tampon de transfert 1X
- Faire tremper le papier et les éponges dans du tampon de transfert 1X
-
- Réaliser le montage dans une cuvette, la cassette baignant dans du tampon de transfert en éliminant les bulles entre les différentes couches avec un rouleau.

Le gel doit être déposé face recto vers le sol (grille noire) et dans l'ordre de chargement/lecture des puits (Figure 41).

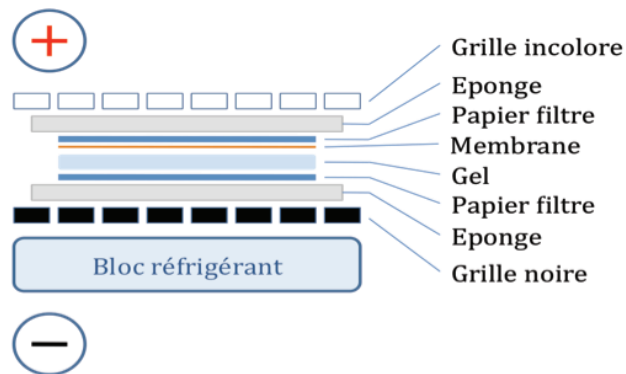


Figure 41 : Montage des gels

- Installer la cassette (refermée) dans la cuve remplie de tampon de transfert 1X.
- Compléter le montage avec un bloc réfrigérant + agitateur magnétique
- Transfert sur la nuit à +4°C à 30V

2.16.5. Hybridation

- Après démontage, rincer rapidement la membrane au PBS (éventuellement 2 bains, maxi 5min)
- Saturation
- Dans TBS-T – 5% Lait Ecrémé : ajouter 5% de lait lyophilisé à la solution TBS-T

- Pendant 1h (maxi 2-3h) à température ambiante
- Découpage des membranes selon poids moléculaire des marqueurs testés et annotation
- Hybridation avec l'Ac primaire
- Dans TBS-T – 5% Lait Ecrémé
- Pendant 1h (maxi 2-3h) à température ambiante, sous agitation lente

Ac	PM de la protéine cible	Compartiment de la protéine cible	Dilution de l'Ac	V _{Ac} à ajouter qsp 10 mL (µL)	Ac secondaire
Ac anti tubuline	60 kDa	C	1/8000	1,25	Anti souris
Ac anti topoisomérase 1	100 kDa	N	1/2500	4	Anti souris
Ac anti pATM (Ser1981)	270 kDa	C+N	1/5000	2	Anti souris
Ac anti ATM 2C1	270 kDa	C+N	1/1000	10	Anti souris
Ac secondaire anti souris	N/A	N/A	1/5000	2	N/A

- Récupérer la solution d'Ac primaire et marquer une croix sur le tube après utilisation
- 5 Lavages de 5min chacun dans grand volume de TBS-T, sous agitation rapide
- Hybridation avec l'Ac secondaire anti-espèce de l'Ac primaire
- Dans TBS-T – 2% Lait Ecrémé ;
- Pendant 45min -1h à température ambiante, sous agitation lente.
- 5 Lavages de 5min chacun dans grand volume de TBS-T, sous agitation rapide

2.16.6. Révélation

- Réaligner les membranes annotées
- Ajouter 2 mL de mélange de révélateur par membrane (50% solution A et 50% solution B à mélanger au dernier moment)
- Incubation 3 min
- Essuyer le surplus et installation des membranes reconstituées dans une interface parfaitement plane et transparente au préalable nettoyée (éthanol) et séchée ;
- Installation dans une cassette et élimination du surplus de révélateur
- Exposition du film (temps long initialement, 45 minutes)
- Développement

Résultats

1. Programme ULICE

Notre engagement dans ULICE nous a permis d'interagir dans des domaines variés et de produire les livrables présentés plus loin. Des Procédures Opérationnelles Normalisées (PON) ont pu être rédigées et proposées aux centres impliqués dans le programme.

Nous avons participé à la rédaction du premier essai multicentrique international en carbone thérapie qui a pu servir de test aux PON proposées dans le cadre du WP2 d'ULICE. Le PHRC ETOILE-(HIT)-CNAO est une étude prospective, comparative randomisée évaluant la RT par ions carbone (réalisée en Italie) contre des modalités alternatives de RT (réalisées en France) chez des patients porteurs de carcinomes adénoïdes kystiques, de chordomes ou de sarcomes localisés inopérables (ou en résection R2).

1.1. D 2.1 Harmonisation des concepts et terminologie appliqués aux paramètres de dose et de volume en photon-, proton- et carbonothérapie. (annexe 1.1)

Résumé

Afin de permettre un échange fructueux de résultats cliniques uniformes, les méthodes et concepts utilisés pour recueillir les données doivent faire l'objet d'un consensus entre les investigateurs.

Les concepts volumétriques utilisés pour prescrire et spécifier le traitement ont été définis dans plusieurs rapports de l'ICRU et décrits dans la première partie de ce livrable. Les volumes cibles macroscopique (GTV) et clinique (CTV) ont une base anatomique en rapport avec l'histoire naturelle de la maladie cancéreuse et ne sauraient dépendre de la modalité de traitement. Les techniques modernes d'imagerie métabolique permettent d'identifier au sein du GTV des compartiments

fonctionnellement particuliers pouvant nécessiter des niveaux de dose différents. L'hadronthérapie se prête particulièrement à ce type d'approche. Le volume cible planifié (PTV) quant à lui reflète la géométrie du traitement et dépend dans une large mesure de la modalité de traitement. Une définition spécifique doit en être donnée. Bien que la dose absorbée soit une quantité princeps pour décrire un traitement conventionnel réalisé en rayonnement de faible TEL dont les effets biologiques sont directement conditionnés par la dose absorbée, il en est tout autre en hadronthérapie par ions carbone. Le volume cible est en effet concerné par des particules de TEL variable caractérisées par un spectre. La relation entre la dose absorbée et les effets biologiques n'est pas univoque mais dépend de plusieurs facteurs: qualité du rayonnement (LET), dose par fraction, débit de dose absorbée, étalement. En outre, l'influence de ces facteurs dépend des conditions expérimentales et des effets biologiques examinés. La dose absorbée seule n'est donc pas suffisamment informative. Il est en outre souvent recherché une répartition de dose biologique homogène correspondant à une distribution de dose absorbée hétérogène. L'efficacité biologique relative (EBR) et la dose iso efficace (D_{isoE}) doivent être spécifiées. L'application pratique de ces concepts dans la prescription et la spécification des traitements est encore débattue au sein du groupe de travail. Par ailleurs cette dose biologique peut être modélisée selon plusieurs approches reposant sur des concepts parfois divergents.

Conclusion

Ce premier livrable identifie ainsi les paramètres du plan de traitement sur lesquels un consensus de définition devra être trouvé afin d'appliquer des irradiations comparables entre plusieurs centres de traitement. La difficulté de maîtriser les différents paramètres de la dose biologique constitue un premier problème pour le groupe.

1.2. D 2.3 Description des tâches avec un projet pour les structures potentielles de recherche clinique au sein d'ULICE. (annexe 1.2)

Résumé

L'hadronthérapie par ions carbone s'est considérablement développée au cours de cette décennie. Tous les centres seront intéressés par la recherche clinique, sachant que cette modalité thérapeutique est considérée comme expérimentale. En outre, nombre d'institutions académiques impliqués dans le développement des techniques photoniques avancées sont partenaires des programmes européens. Cette situation particulière offre la chance unique de mettre en place simultanément en Europe les infrastructures, un réseau international et une structure de recherche autonome pouvant organiser des investigations translationnelle et cliniques performantes en hadronthérapie.

L'objectif principal d'une telle infrastructure de recherche est d'instaurer les futurs programmes de recherche clinique multicentriques afin de fournir les éléments de preuve concernant les résultats oncologiques et la tolérance à l'hadronthérapie. Des outils spécifiques pour la conception, la planification, la réalisation et l'évaluation de ce type de recherche de haut niveau doivent être définis grâce à l'apport des concepts émanant des autres work-packages d'ULICE. Il sera ainsi question de comparer prospectivement les résultats de différentes qualités de radiations et différentes techniques utilisées seules ou combinées. Des séquences thérapeutiques innovantes pourront être testées, faisant intervenir chimiothérapie, chirurgie... Les champs de recherche plus fondamentaux qui s'y rapportent pourront parfaitement s'articuler.

Un organe spécifique doit être mis en place dans le cadre d'ULICE pour guider la conception, la réalisation, l'exploitation et l'évaluation continue des actions de recherche clinique et translationnelle construites autour de bases de données centralisées. Un Comité exécutif de cet organe de recherche doit en outre être mis en place

Conclusion

La création d'une infrastructure de recherche fédérative apparaît indispensable pour concevoir et conduire des études prospectives collaboratives suffisamment robustes pour étayer l'utilité de l'hadronthérapie.

1.3. D 2.5 Harmonisation et recommandations de prescription et rapport de la dose absorbée et des histogrammes dose-volume basé sur des concepts 3D & 4D. (annexe 1.3)

Résumé

L'harmonisation des informations physiques, biologiques et cliniques à échanger constitue une étape indispensable dans la réalisation d'études collaboratives pertinentes.

Les concepts cliniques et techniques ainsi que la terminologie et les modes opératoires doivent être définis de manière consensuelle et large. Les traitements, a fortiori innovants, doivent par ailleurs être rapportés de manière harmonisée pour en permettre une évaluation la plus informative possible pour la communauté et permettre la reproduction des stratégies thérapeutiques avec une sécurité et une efficacité maximales pour le patient. Les outils standardisés validés au niveau international doivent être utilisés le plus souvent possible pour définir le stade de la maladie, les grades de toxicité ou encore la réponse locale.

Si nous prenons l'exemple du PTV, bien que sa définition soit invariable, sa délimitation ne peut se résumer à une expansion automatique autour du CTV en hadronthérapie. En effet du fait de la distribution de dose en profondeur, la marge ne saurait être isotrope et notre groupe recommande la définition d'un PTV pour chaque faisceau délivré. La précision de la balistique rend par ailleurs l'impact des mouvements du patient très problématique du fait de la composition spectrale volontairement hétérogène des faisceaux adaptée à la position et la composition tissulaire statique observées lors de la simulation.

Si nous prenons maintenant l'exemple de la définition et de la spécification de la dose dans les plans d'hadronthérapie, les histogrammes dose-volume (HDV) semblent avoir toute leur place à quelques adaptations près : les concepts et

méthodes de calcul des doses biologiques doivent être précisés tout en conservant les données physiques brutes. Les données des HDV doivent également être rapportées aux données anatomiques.

Conclusion

Les sources de variabilité inter centrique entre des protocoles développés pour une même localisation ont été identifiées. Les paramètres en question doivent être définis, mesurés et rapportés de manière consensuelle. En cas d'utilisation d'une modélisation de la dose biologique, et du fait de la pluralité des approches, les données brutes alimentant les modèles doivent toujours être conservées.

1.4. D 2.7 Modalités de rechute tumorale et de "toxicogénèse" en carbonothérapie. (annexe 1.4)

Résumé

L'évaluation des résultats est cruciale pour la compréhension et l'amélioration des stratégies de traitement actuelles et à venir. L'évaluation des résultats dans le domaine de l'hadronthérapie impliquera principalement l'analyse des récurrences locales et les effets secondaires liés au traitement. Compte tenu de la distribution hétérogène de la dose délivrée par les faisceaux de particules, l'évaluation des résultats sera difficile et demandera des efforts conceptuels supplémentaires par rapport à la RT classique.

Les outils pertinents pour l'évaluation des résultats en hadronthérapie pourraient comprendre le recalcul de la dose, l'analyse des histogrammes dose-volume (sur la base d'une délimitation harmonisée des structures), les analyses dose-effet (par recherche d'une corrélation entre un événement spécifique tel que la récurrence locale et le niveau de dose correspondant) ou encore l'imagerie multimodale permettant un recalage de la récurrence sur la dosimétrie. Pour illustrer ces outils, un cas clinique est discuté et un exemple de CRF est fourni.

Conclusion

Du fait du pronostic local et du caractère lentement évolutif des tumeurs éligibles à une hadronthérapie par ions carbone, mais également du fait de la répartition hétérogène de la dose biologique, des outils spécifiques doivent être développés pour établir des relations dose-effet (toxique ou tumoral) robustes.

1.5. D 2.9 Concepts intégrés de dose absorbée 3D/4D et variations des effets biologiques avec l'EBR, le fractionnement et l'étalement. (annexe 1.5)

Résumé

La dose iso efficace est un concept développé pour comparer deux modalités d'irradiation réalisées dans des conditions différentes. D'une manière générale, la dose absorbée subit une fonction de transformation qui intègre le fractionnement, le débit, et surtout la qualité de la radiation (EBR)... Toutefois, devant l'imprécision de la mesure de l'EBR dans l'état actuel des connaissances, la dose absorbée et la distribution de dose doivent toujours être rapportées en plus de toute autre représentation. La difficulté d'estimer l'EBR en hadronthérapie par ions carbone tient essentiellement à l'hétérogénéité intentionnelle du spectre de TEL, à la fragmentation, aux modifications de fractionnement et à la multiplicité des modèles utilisés entre différents centres. Toutes ces variables devront être harmonisées dans les essais collaboratifs.

Pour les traitements délivrés dans des conditions d'irradiations différentes, les doses iso efficaces peuvent être combinées: elles sont additives. Les conditions de référence, le système biologique choisi, l'effet clinique d'intérêt ainsi que la méthode adoptée pour préciser les doses délivrées en un point ou dans un volume doivent toujours être clairement détaillés.

Conclusion

Toutes les variables qui caractérisent la dose iso efficace devront être harmonisées dans les essais collaboratifs. En parallèle la cartographie de dose absorbée et de spectre de TEL pour chaque voxel devra être conservée.

1.6. D 7.3 Services développés pour l'acquisition et l'exploitation des données (annexe 1.6)

Résumé

ULICE a permis de développer des outils informatiques, des politiques de partage de données et des normes et sémantiques communes pour faciliter le partage de données entre les centres dans le cadre des essais cliniques. Cette initiative est inspirée de l'approche CancerGrid développée par le NCI pour faciliter l'échange de données sécurisées entre les différents investigateurs à partir des recommandations CONSORT. Les variables à recueillir sont transformées en métadonnées qui deviennent interopérables et l'essai peut ainsi être géré de façon autonome et exhaustive : génération d'eCRF, configuration des services de randomisation et d'éligibilité des patients, paramétrage du sous-système de sécurité, facilitation de l'analyse. Les principaux avantages de ce type d'infrastructure sont un mécanisme uniforme d'enregistrement des essais, une réduction des coûts, une implémentation rapide et surtout la facilitation de la réalisation de méta analyses grâce à la sémantique partagée. En lien avec d'autres WP, un méta modèle de Markov d'analyse coût-bénéfice a été mis au point pour permettre l'échange de modèles, simulations et paramètres d'intérêt afin que la communauté puisse apprécier le retentissement médico-économique des traitements à l'essai.

Conclusion

Une infrastructure spécifique à l'hadronthérapie par ions carbone a ainsi pu être générée et testée grâce à notre essai ETOILE-ULICE (HIT ou CNAO).

1.7. D 9.1 Rapport sur les aspects scientifiques et techniques des centres existants et planifiés, sur les aspects démographiques et géographiques de la distribution des centres et sur les critères cliniques d'éligibilité à la carbonothérapie. (annexe 1.7)

Résumé

La population européenne compte environ 500 millions d'habitants mais très peu sont susceptibles d'avoir accès à un traitement par hadronthérapie par ions carbone du fait de la rareté des indications et des ressources. L'impact médical est donc encore très faible. Toutefois, la plupart des analyses économiques ont montré que l'hadronthérapie peut être rentable à long terme compte tenu de la longue durée de vie des accélérateurs et de l'efficacité des traitements. Quoi qu'il en soit le niveau élevé de l'investissement initial freine le développement de nouveaux centres. Il est intéressant de corréliser dans différents pays, le nombre d'installations avec des indicateurs économiques de base tels que le produit intérieur brut (PIB). En outre, il est d'un grand intérêt de comprendre les politiques de remboursement des soins dans les pays de l'UE. Une étude approfondie des coûts de traitement et le remboursement par les assurances publiques ou privées et dans tous les pays européens est au-delà de la portée du présent projet.

Les Indications d'hadronthérapie par ions carbone sont encore un sujet de débat. Dans cet article, afin de préciser l'efficacité médico-économique de cette technique, trois scénarii sont simulés:

- un scénario conservateur dans lequel seules seront considérées les indications qui ont soit un niveau de preuve élevé ou une pratique bien établie ou une justification extrêmement forte ;
- un scénario pragmatique dans lequel les indications seront calquées sur les pratiques des centres déjà actifs;
- et un scénario limité dans lequel les cancers potentiellement traitables en hadronthérapie (selon l'évaluation des experts ou l'estimations de sociétés savantes) seront considérés.

Conclusion

La dissémination rationnelle de l'hadronthérapie par ions carbone sur le territoire européen passe par la précision des indications dans lesquelles cette technique offre un service rendu favorable, l'analyse prévisionnelle des paramètres géographiques, démographiques et financiers liés à l'impact d'un nouveau centre et le développement de recommandations en ce sens.

- 1.8. D 10.3 Protocoles standardisés des centres actifs (annexe 1.8) & D 10.5 Site web d'ULICE mis à jour avec les protocoles standardisés [mois 42] (annexe 1.9)

Résumé

De multiples interventions sont nécessaires, en plus de la délivrance du faisceau aux volumes cibles, afin de tirer un bénéfice optimal de la précision et de la sur efficacité biologique de la carbone thérapie. Citons les procédures d'immobilisation, de repositionnement, de contrôle du mouvement, de suivi et d'imagerie de la cible. Parfois ces procédures sont similaires à celles utilisées en RT conventionnelle; parfois elles sont spécifiques à l'hadronthérapie.

Les centres les plus expérimentés ont développé leurs propres procédures et les ont implémentées en pratique, sans toujours les décrire de manière détaillée dans les publications.

Le premier article a pour objectif de passer en revue les diverses procédures, en particulier d'immobilisation des patients, adoptés dans les centres actifs en Europe et au Japon. En effet nous avons soulevé auparavant l'absolue nécessité d'un positionnement optimal tant le gradient de dose observé latéralement et en profondeur est abrupt. Plus qu'en RT utilisant les photons, le moindre écart dans la géométrie (position ou conformation) du patient peut avoir des conséquences cliniques significatives. Les protocoles d'immobilisation ont ainsi été colligés selon les différentes localisations anatomiques, traduits et mis à disposition de la communauté.

Le second article a établi des recommandations et une Procédure Opérationnelle Normalisée consensuelle à partir des données collectées dans les centres. Des

recommandations d'implémentation de ces procédures d'immobilisation sont également proposées.

Conclusion

La comparaison des résultats des essais cliniques collaboratifs en hadronthérapie ne peut se concevoir que si les procédures d'immobilisation des patients sont homogènes et efficaces, dans la mesure où toute variation géométrique dans la délivrance du traitement peut avoir des conséquences médicales significatives.

- 1.9. D 11.11 Elaboration et implémentation des essais cliniques (annexe 1.10) & D 11.8 Espace dédié sur le site web d'ULICE pour le partage de données cliniques (annexe 1.11)

Résumé

L'implémentation d'essais cliniques internationaux en hadronthérapie par ions carbone nécessite une infrastructure spécifique et la création d'outils de partage des informations entre les différents centres. Une plateforme collaborative d'échange de données cliniques, physiques et biologiques destinée aux patients inclus dans les essais thérapeutiques internationaux a été créée dans le cadre d'ULICE. Les données collectées sont accessibles aux partenaires impliqués dans le programme pour permettre de réaliser des études complémentaires. Cette plateforme prévoit également un accès aux praticiens de proximité afin de soumettre de manière sécurisée les cas cliniques de leurs patients pour discussion des indications d'hadronthérapie au sein d'un comité spécialisé.

En outre devant la multiplicité des questions médico-scientifiques qui pourront être étudiées, les projets de recherche qui seront présentés devront suivre une filière unifiée visant à garantir la réalisation des études les plus prioritaires selon une méthodologie adaptée. Une grille d'évaluation standardisée a été mise au point pour permettre à un comité de relecture centralisé indépendant de statuer sur les projets soumis. En parallèle, les projets sont soumis à un comité d'éthique centralisé après approbation par les instances réglementaires nationales. Les patients inclus dans les essais sélectionnés dans le cadre d'ULICE auraient pu bénéficier de temps de

faisceau mis à disposition par les 2 centres actifs dans le cadre des activités TNA d'ULICE.

Une simulation de rédaction et d'implémentation des concepts, procédures et outils développés dans le cadre d'ULICE a été réalisée dans le cas particulier de notre essai multicentrique. Une version finale satisfaisant les exigences des instances réglementaires françaises a toutefois été retenue. Le premier patient devrait être inclus prochainement

Conclusion

Un processus de sélection des essais cliniques soumis par les équipes impliquées en hadronthérapie en Europe a été mis en place. Il repose sur un comité de relecture composé d'experts internationaux. Ce comité a la charge de vérifier la pertinence, la faisabilité et la méthodologie des études proposées. Il devra veiller à ce que les concepts et procédures élaborés dans le cadre d'ULICE soient respectés. En parallèle une plateforme d'échange des données a été conçu.

2. Recherche de nouveaux biomarqueurs de radiosensibilité individuelle

Les cinq premiers articles ont été (co)rédigés pendant la première période de la thèse. Ils nous ont permis de nous imprégner des concepts, des techniques d'étude et de la méthodologie optimale afin de rechercher des paramètres prédictifs de la radiosensibilité. Le développement de tels tests doit suivre une démarche précise et rigoureuse en vérifiant à la fois la corrélation quantitative avec la radiosensibilité et l'évolution des phénomènes avec la dose. Les modèles expérimentaux doivent également être réalistes, pertinents et le plus proche possible de la clinique. Ces étapes précèdent l'étape de validation des tests à l'aide d'essais cliniques ad hoc.

Le dernier article illustre le développement de biomarqueurs de radiosensibilité individuelle innovants basés sur la fonctionnalité de la signalisation et la réparation des CDB et s'appuyant sur le concept de transit cyto-nucléaire d'ATM.

2.1. Article 1 : Radiosensibilité, radiocurabilité et réparation

La première partie traite de la définition historique de la radiosensibilité cellulaire témoin d'une réponse globale intégrée pan cellulaire, en l'absence d'outils et de connaissances mécanistiques. La mort radiobiologique put être définie comme la perte de capacité proliférative par unité de dose, ce qui permit de développer dans les années 1940-50 les premiers tests clonogéniques qui font toujours office de référence à l'heure actuelle. Cet outil permet encore aujourd'hui de quantifier, à partir d'une biopsie, l'effet global d'une intervention sur la radiosensibilité cellulaire. La comparaison des courbes de survie entre différentes tumeurs ont alors conduit Fertil et Malaise à définir le concept de radiosensibilité intrinsèque, soulevant son déterminisme génétique au début des années 1980.

La seconde partie introduit la révolution technologique et conceptuelle observée dans les années 1980-90 permettant d'aborder la mécanistique de la radiosensibilité cellulaire. Les modèles d'études se sont ensuite complexifiés et rapprochés de l'Homme. Progressivement les lésions pivot de la létalité radio induite ont été identifiées au niveau de l'ADN des cellules, en lien avec des radiolésions délétères : les CDB. Le nombre de CDB non réparées apparut corrélé avec les dommages chromosomiques et la radiosensibilité cellulaire. La fonctionnalité de la réparation acquit ainsi toute son importance.

La troisième partie offre une dissection des voies moléculaires de signalisation de la radiosensibilité cellulaire : détection des CDB par des protéines sentinelles, signalisation et recrutement sur site d'autres PI3 kinases, amplification du signal, organisation d'une réponse coordonnée par des protéines effectrices impliquant le cycle cellulaire, la réparation et la régulation transcriptionnelle pour aboutir à la mort mitotique. Le rôle pivot d'ATM est ici souligné.

La quatrième partie met en perspective les implications diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques découlant des intrications cliniques et moléculaires de la radiobiologie moderne.

L'index thérapeutique de la RT peut être optimisé en radio sensibilisant les tumeurs, par exemple en modulant la réparation de manière plus ou moins ciblée. Une revue exhaustive des essais thérapeutiques impliquant les inhibiteurs du domaine PI3 kinase et de PARP a été réalisée. La prédiction de la radio curabilité tumorale apparaît également comme une donnée intéressante à connaître a priori. En particulier des radio traceurs dont la captation est proportionnelle au métabolisme tumoral (prolifération, hypoxie, néoangiogenèse...) sont régulièrement synthétisés et exploités en médecine nucléaire. Des sous compartiments tumoraux peuvent alors être individualisés grâce à la fusion d'images et faire l'objet d'une escalade de dose personnalisée. Ces traceurs d'intérêt ont été passés en revue. Enfin les tests biologiques prédictifs de la radiosensibilité tumorale ont été exposés.

Conclusion pratique : Ce premier article de revue fait office de préambule à ce travail de thèse. Bien que centré sur la radiosensibilité tumorale, il met en avant les bases biologiques de la radiosensibilité cellulaire, l'état de l'art des techniques de radiobiologie et des concepts centraux que nous fumes amené à utiliser.



Disponible en ligne sur
 ScienceDirect
 www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
 EM|consulte
 www.em-consulte.com



Revue générale

Radiosensibilité, radiocurabilité et réparation

Radiosensitivity, radiocurability and DNA repair

G. Vogin¹

Centre Alexis-Vautrin, 6, avenue de Bourgogne, 54511 Vandœuvre-lès-Nancy, France

INFO ARTICLE

Historique de l'article :

Reçu le 2 juillet 2010
 Reçu sous la forme révisée
 12 octobre 2010
 Accepté le 26 octobre 2010
 Disponible sur Internet le 22 février 2011

Mots clés :

Radiosensibilité cellulaire
 Radiosensibilité intrinsèque
 Cassures double-brins
 Aberrations chromosomiques
 Prolifération
 Réponse aux dommages de l'ADN
 Inhibiteurs de réparation
 Test prédictif

Keywords:

Cell radiosensitivity
 Intrinsic radiosensitivity
 Double strand breaks
 Chromosome aberrations
 Proliferation
 DNA damage response
 DNA repair inhibitors
 Predictive assay

RÉSUMÉ

L'amélioration de la précision balistique a fait office de pierre angulaire du succès de la radiothérapie moderne. La dose peut désormais être délivrée au millimètre près ou se conformer à des cibles de géométrie complexe ou encore s'adapter aux mouvements du patient et des organes internes. À côté de l'amélioration de la précision balistique, la modulation des effets biologiques des radiations ionisantes peut également permettre d'accroître la radiocurabilité des tumeurs humaines. Il s'agissait là de l'intitulé du concours pour le prix Lucien-Mallet 2009 organisé par la Société française de radiothérapie oncologique (SFRO) et le centre Antoine-Béclère, sous l'égide de la Fondation de France. Nous nous proposons dans cette revue de décrire précisément la réponse moléculaire intégrée de la cellule aux dommages radio-induits de l'ADN. En partant des premières observations, nous introduisons le concept de radiosensibilité cellulaire en tant que réponse globale de la cellule irradiée. En suivant l'amélioration des performances des outils d'observation, nous entrons alors à l'intérieur de la cellule et plus spécifiquement dans son noyau pour y décrire les lésions les plus délétères. Dans la partie suivante, grâce aux données issues des techniques de biologie moléculaire et d'immunofluorescence indirecte, nous schématisons la réponse globale orchestrée par les protéines de signalisation et de réparation des lésions précédemment décrites. Nous finissons par en soulever les implications diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques qui vont découler des intrications cliniques et moléculaires de la radiobiologie moderne.

© 2011 Société française de radiothérapie oncologique (SFRO). Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

ABSTRACT

Improvements in accuracy stand as the heart of the success of today's radiotherapy. The dose may be delivered with a sub millimetric accuracy, may also conform to complex shapes, or track external and internal organ motions. In parallel, we may increase the tumour's radiocurability by modulating the biological effects generated by ionizing radiation into the patient. It was precisely the topic of the 2009' Lucien-Mallet prize organized by the French Society for Radiation Oncology (SFRO) and the *Centre Antoine-Béclère* under the auspices of the *Fondation de France*. In this review we will precisely describe the integrated molecular response to ionizing radiations. Starting from early observations, we are going to introduce the concept of cellular radiosensitivity as the global response of the irradiated cell. We will then focus into the cell and especially its nucleus. We will describe here the most complex and deleterious radio-induced damages. In the next chapter, we will dissect the molecular pathway that aims to detect and repair the previous lesions. The last part of the review will finally deal with the diagnostic, prognostic and therapeutic impacts emerging from the alliance between clinical and molecular radiobiology.

© 2011 Société française de radiothérapie oncologique (SFRO). Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Découvertes en 1895 par Röntgen, les radiations ionisantes ont la propriété princeps d'interagir avec la matière en transférant toute ou partie de leur énergie. Rayonnements électromagnétiques

Adresse e-mail : guillaumevogin@gmail.com

¹ Lauréat du prix Lucien-Mallet 2009.

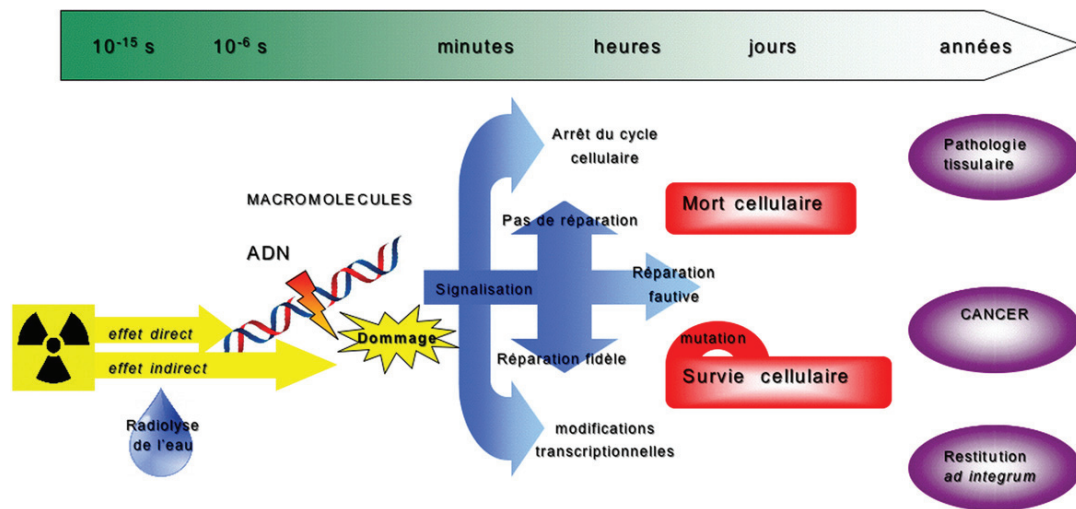


Fig. 1. Effets biologiques des radiations ionisantes dans le temps et l'espace.

et particulaires, elles possèdent une énergie cinétique supérieure à l'énergie de liaison des atomes constitutifs de la molécule d'eau. Dans la matière vivante, ce transfert d'énergie est suivi d'une cascade de réactions physicochimiques puis biologiques à l'échelon moléculaire, subcellulaire, cellulaire, tissulaire et enfin au niveau de l'organisme entier. Les conséquences peuvent être bénéfiques (phylogénèse, radiothérapie) ou au contraire nocives (lésions tissulaires aiguës, tardives, carcinogénèse). Les lésions radio-induites s'ajoutent aux lésions consécutives au métabolisme cellulaire normal (Fig. 1).

Pendant l'étape cellulaire, les radiations, par les mécanismes induits lors des premières phases, altèrent la structure des macromolécules et interfèrent avec les voies métaboliques, ce qui perturbe les principales fonctions de la vie cellulaire. Les lésions produites sont signalisées et prises en charge par les systèmes de réparation, alors que la cellule marque un arrêt dans le cycle cellulaire. Si la cellule est incapable de réparer les lésions, elle meurt immédiatement ou à la mitose suivante (mort mitotique). Divers mécanismes de mort cellulaire ont été décrits : mort mitotique, apoptose, sénescence, autophagie. Une mauvaise réparation de ces dommages peut se traduire par l'apparition de lésions au niveau des tissus, ce qui constitue l'étape tissulaire. À plus long terme, une instabilité génique peut se développer, aboutissant à des mutations initiateuses d'anomalies génomiques pouvant devenir carcinogènes quand elles touchent des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs. Celle-ci se manifeste par une accumulation d'anomalies au fil des générations cellulaires, telles que : réarrangements chromosomiques, formation de micronoyaux, aneuploïdie, apparition de mutations tardives (avec spectre différent), amplification de gènes, mort cellulaire différée (Fig. 2).

2. Radiobiologie descriptive : la radiosensibilité cellulaire

Entre les années 1940 et 1980, les études radiobiologiques se sont tout d'abord intéressées à la description de la réponse intégrée du tissu, puis de la cellule dans son ensemble. L'objectif était de prédire la probabilité de contrôle tumoral par les radiations : quelle tumeur pourra être stérilisée et laquelle ne répondra pas ? En parallèle, les mêmes questions se posaient quant à la tolérance des tissus sains. L'interrogation centrale, toujours d'actualité, est de savoir si la radiosensibilité tumorale au même titre que celle des tissus sains (radiosensibilité individuelle) possède un déterminisme génétique.

2.1. Mort cellulaire radio-induite et radiosensibilité cellulaire

En irradiant des testicules de béliers en 1906, Bergonié et Tribondeau avaient déjà constaté que les tissus ou tumeurs les plus différenciés et les moins prolifératifs étaient les moins radiosensibles. Paterson a proposé en 1936 une classification de radiosensibilité tumorale selon le type histologique en trois catégories :

- tumeurs radiosensibles : tumeurs embryonnaires et hématolymphoïdes ;
- tumeurs de radiosensibilité intermédiaire : carcinomes épidermoïdes et adénocarcinomes ;
- tumeurs radiorésistantes : sarcomes, mélanomes.

Cependant, certaines tumeurs de même type histologique peuvent répondre différemment à la radiothérapie ; il est ainsi nécessaire de se placer à l'échelon de la cellule cancéreuse.

Glucksmann a mis au point en 1941 le premier test cellulaire. Une biopsie de la périphérie d'une tumeur était examinée au microscope optique avant et pendant la radiothérapie. Les cellules étaient dénombrées et classées selon quatre catégories : cellules en mitose, en cours de différenciation, quiescentes et mortes [1]. La cinétique de répartition des cellules détermine le profil de réponse thérapeutique : favorable si le nombre de cellules mitotiques et quiescentes diminue, défavorable dans le cas contraire ; 150 patientes atteintes de carcinome du col utérin ont été stratifiées selon cette méthode et suivies sur plusieurs années. Quarante-cinq cancers étaient de pronostic favorable. La corrélation entre la prédiction et l'évolution effective était de 87,4 % (Fig. 3).

Les premières courbes de survie in vitro ont été établies en 1956 par Puck et Markus. Elles ont permis de quantifier la réponse aux radiations ionisantes de lignées de cellules saines et tumorales. Le taux de survie clonogénique, représenté en ordonnée des courbes, reflète la capacité de la cellule irradiée à donner naissance à un clone, voire une colonie identifiable à l'œil nu (au moins 50 cellules par définition, soit cinq à six générations) [2]. Par extrapolation, cette colonie correspondrait à une récurrence tumorale in vivo. Il est admis que seules les cellules initiateuses de tumeurs sont clonogènes, ce qui représenterait une cellule tumorale sur 10 000. Revenons quelques instants sur la notion de mort/survie cellulaire. Une cellule irradiée est déclarée « morte ou inactivée » si elle a perdu sa capacité à proliférer. Une cellule dite morte peut ainsi continuer à métaboliser et réparer. La radiosensibilité cellulaire est ainsi

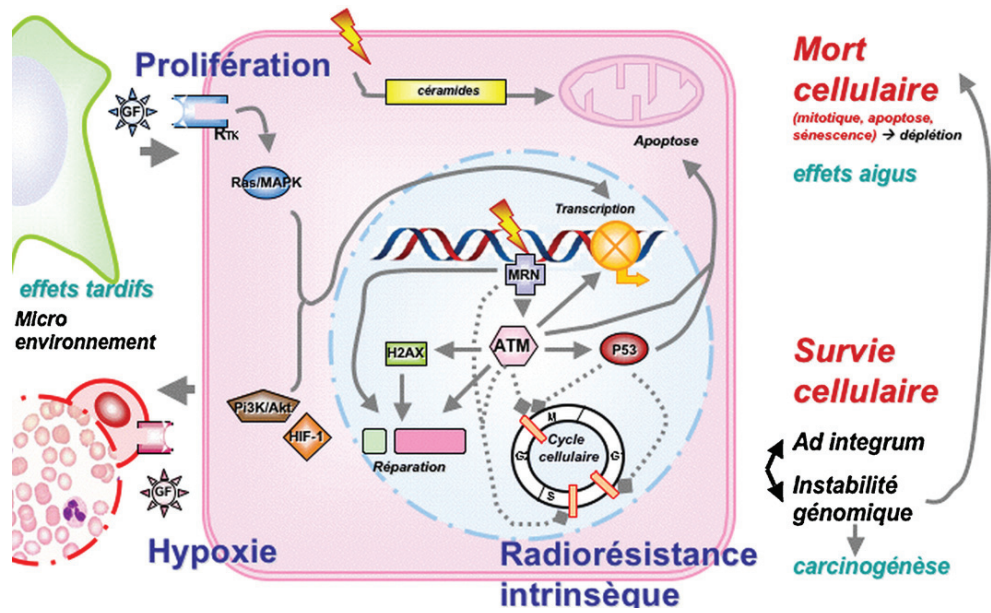


Fig. 2. Vision actuelle des effets des radiations ionisantes sur la cellule tumorale et son environnement. Prolifération, hypoxie, radiorésistance intrinsèque incarnent les principaux déterminants de la radiosensibilité cellulaire.

définie comme la perte de capacité proliférative par unité de dose. Outre les déterminants cliniques (cellule et tissu d'origine, extension tumorale, taille, morphologie, état général de l'hôte, âge, sexe) et thérapeutiques (étalement, fractionnement, volume traité, thérapie associée), les déterminants biologiques de la radiosensibilité cellulaire sont multiples :

- nombre de cellules clonogènes, corrélé avec l'efficacité d'étalement in vitro, inversement proportionnel à la dose permettant de contrôler 50% des tumeurs (TCD50) in vivo. Ce nombre conditionne le contrôle tumoral ;

- prolifération cellulaire approchée expérimentalement par le temps de doublement ou T_{pot} ou encore en incorporant des nucléotides de synthèse marqués, telle la bromodéoxyuridine (BrdU). Le *tumor growth delay* (TGD) in vivo appréhende la repopulation par les cellules clonogènes ;
- effet oxygène ;
- radiosensibilité intrinsèque intégrant le patrimoine génétique et épigénétique (gènes de réparation, expression et fonction des oncogènes, cycle cellulaire, apoptose). Elle est au cœur de notre exposé.

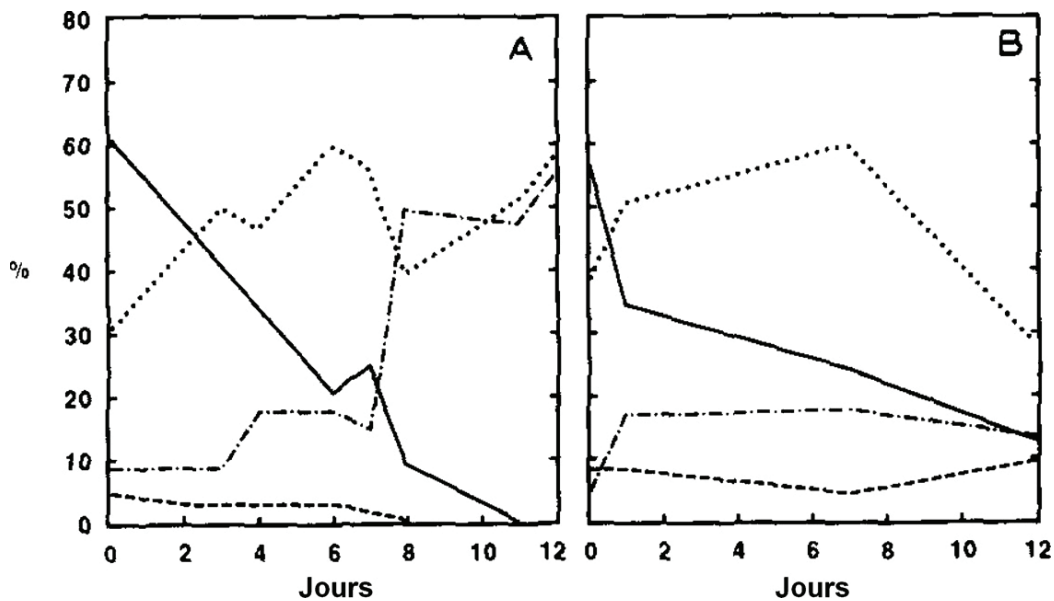


Fig. 3. Comparaison d'un profil tumoral favorable (A) et défavorable (B) : (—) cellules quiescentes ; (····) cellules en cours de différenciation ; (-.-) cellules mortes ; (---) cellules en mitose.

D'après Glucksmann, 1941 [1].

Tableau 1

Biomarqueurs mis en évidence par Fertil et Malaise pour stratifier les lignées cellulaires selon leur radiosensibilité (d'après Fertil et Malaise, 1981 [3]).

Catégorie clinique	# lignées	Valeurs moyennes des biomarqueurs		
		SF 1,5	α	Dmoy
Radiosensibles ^a	38	0,35	0,59	1,45
Intermédiaires ^b	27	0,51	0,39	2,13
Radiorésistantes ^c	45	0,55	0,33	2,32

^a Lymphomes ($n=18$), carcinomes en bague à chaton ($n=9$), neuroblastomes ($n=4$), médulloblastomes ($n=2$), myélomes ($n=2$), carcinomes ovariens ($n=2$), néphroblastome ($n=1$).

^b Carcinomes épidermoïdes ($n=9$), adénocarcinomes lieberkühniens ($n=6$), carcinomes bronchiques non à petites cellules ($n=6$), carcinomes vésicaux ($n=4$), adénocarcinome mammaire ($n=1$), adénocarcinome pancréatique ($n=1$).

^c Mélanomes ($n=36$), glioblastomes ($n=5$), ostéosarcomes ($n=3$), tumeur bénigne rénale ($n=1$).

Fertil et Malaise ont déterminé graphiquement en 1981, sur les courbes de survie, divers indicateurs permettant de comparer les lignées cellulaires entre elles dans les mêmes conditions expérimentales : SF2 (fraction survivante à 2 Gy), D37 (dose létale moyenne), pente initiale α , dose moyenne d'inactivation (aire sous la courbe) (Tableau 1). Ces biomarqueurs sont spécifiques pour chaque lignée de sorte que ces courbes ne se croisent jamais. Les mêmes courbes ont pu être établies *in vivo* avec une excellente corrélation, ce qui a rendu leur emploi légitime [3]. Entre 0,7 et 10 Gy, les courbes de survie des cellules de mammifères obéissent généralement à un modèle linéaire-quadratique.

La radiosensibilité intrinsèque est définie comme la probabilité de mort cellulaire par unité de dose pour une lignée donnée, dans des conditions données (*in vitro*). Pour la première fois, il a été démontré que les tumeurs les plus difficiles à stériliser par la radiothérapie fournissaient les lignées les moins radiosensibles (Fig. 4).

Deacon et al. ont confirmé ces données en 1984. Les effets du transfert électronique linéique, du fractionnement, du cycle cellulaire, du débit de dose, de l'oxygénation du milieu, de l'ajout de facteurs de croissance ou de molécules chimiques et du microenvironnement ont pu être modélisés sans qu'on en comprenne encore les mécanismes sous-jacents [4]. La SF2 semble être le meilleur indicateur pronostique de radiocurabilité et α reflète la radiosensibilité intrinsèque.

Notons toutefois que ces tests clonogéniques comportent de nombreuses limites : difficultés techniques, chronophagie, manque de reproductibilité (hétérogénéité intratumorale), mauvaise résolution, nécessité d'une biopsie, croissance lente des cellules primaires et culture délicate.

Au cours de la même période, les modèles expérimentaux sont perfectionnés.

In vitro, les lignées cellulaires peuvent être saines primaires, saines immortalisées (CHO, V79), saines transformées par des virus dont SV40, conférant alors une perte d'inhibition contact, ou tumorales (HeLa). Ces lignées sont toutefois soumises à la pression de l'environnement du laboratoire dans lequel elles sont conservées et sont par conséquent exposées à des variations génétiques et donc fonctionnelles. Les lignées primaires dégèrent généralement après 20 à 30 passages.

Les sphéroïdes multicellulaires permettent d'étudier pour la première fois l'effet oxygène.

Les lignées tumorales transplantées sur animal prennent en compte le microenvironnement. Avec la multiplication des greffes, le phénotype cellulaire dévie. En outre, le rejet n'est pas sans poser problème.

Il est possible d'observer des tumeurs primitives chez l'animal. Elles peuvent survenir spontanément chez des espèces prédisposées ou être induites par des carcinogènes.

Les tumeurs humaines peuvent également se voir xénogreffées sur un animal hôte immunodéprimé.

Enfin, les biopsies fraîches prélevées chez le patient puis mises en culture restent le *gold standard*.

La publication des travaux de Fertil et Malaise a pour la première fois soulevé le déterminisme génétique de la radiosensibilité intrinsèque et fait émerger le concept de réparation (épaulement des courbes : β), engageant la transition vers la radiobiologie moléculaire. Certaines protéines impliquées dans des voies de signalisation sous-tendent les processus moléculaires de la radiosensibilité cellulaire.

2.2. Les déterminants de la mort cellulaire

2.2.1. Cible moléculaire : l'ADN et ses compactions : les lésions moléculaires radio-induites

Plongeons maintenant à l'intérieur de la cellule, rendu accessible par les progrès des microscopes, et des techniques d'imagerie, l'avènement des microfaisceaux et la biologie cellulaire et moléculaire. Les radiations ionisantes engendrent diverses lésions touchant l'ensemble des compartiments cellulaires... avec une efficacité inégale. Le noyau semble être la clé de la létalité radio-induite. L'ADN est la macromolécule majoritaire en son sein. Supportant l'information génétique, l'ADN est également la matrice pour sa propre réplication et pour la transcription. Son endommagement peut conduire à des dysfonctionnements pouvant aboutir à la mort cellulaire, à l'induction de mutations et d'aberrations chromosomiques, à une transformation cellulaire et à la cancérogenèse. Plusieurs expériences historiques nous permettent de considérer le noyau comme l'organite clé de la létalité radio-induite. Ainsi, pour induire 50 % de létalité chez un fibroblaste de hamster chinois, il faut délivrer 1 à 3 Gy au noyau contre 200 à 500 Gy au cytoplasme [5]. Les mêmes résultats ont été obtenus en incorporant des radionucléides dans diverses macromolécules dont l'ADN [6]. Enfin, la substitution de la thymidine par des pyrimidines halogénées radiosensibilise la cellule [7]. La micro-injection d'ADN de synthèse (plasmide linéarisé) porteur d'une seule cassure double-brin (enzyme de restriction) dans un noyau de fibroblaste est suffisante pour induire un arrêt en G1 p53-dépendant de la cellule [8]. L'ADN passe par différents stades de compaction de radiosensibilité différente au fil du cycle cellulaire. Les particules chargées primaires ou secondaires déposent à son niveau directement ou via la radiolyse de l'eau une énergie suffisante pour induire un spectre de lésions moléculaires bien caractérisé (Fig. 5).

Les plus fréquentes sont les dommages de base, les ponts intra- ou interbrins, les cassures simple-brin. Bien que fréquentes, ces lésions sont peu efficaces dans l'induction de la mort cellulaire par les radiations ionisantes. La formation de lésions complexes de l'ADN nécessite un dépôt d'énergie supérieur à 100 eV/nm³, soit 100 fois plus que nécessaire pour induire un dommage de base.

Les cassures double-brin sont des lésions constituées de deux cassures situées en vis-à-vis sur un brin différent de l'ADN. Ces cassures sont séparées l'une de l'autre, d'une distance inférieure ou égale à une dizaine de paires de bases. Elles peuvent résulter d'un événement ionisant touchant les deux brins simultanément ou de deux cassures simple-brin indépendantes. Les cassures double-brin sont des lésions très délétères et une large proportion de ces dommages ne peut être réparée par la cellule suite à l'irradiation. En cas de non-réparation, elles sont souvent létales pour la cellule. Le nombre de cassures double-brin non réparées peut être corrélé avec la radiosensibilité cellulaire. Les cassures double-brin peuvent être formées :

- par la coïncidence de deux cassures simple-brin sur deux brins opposés ;

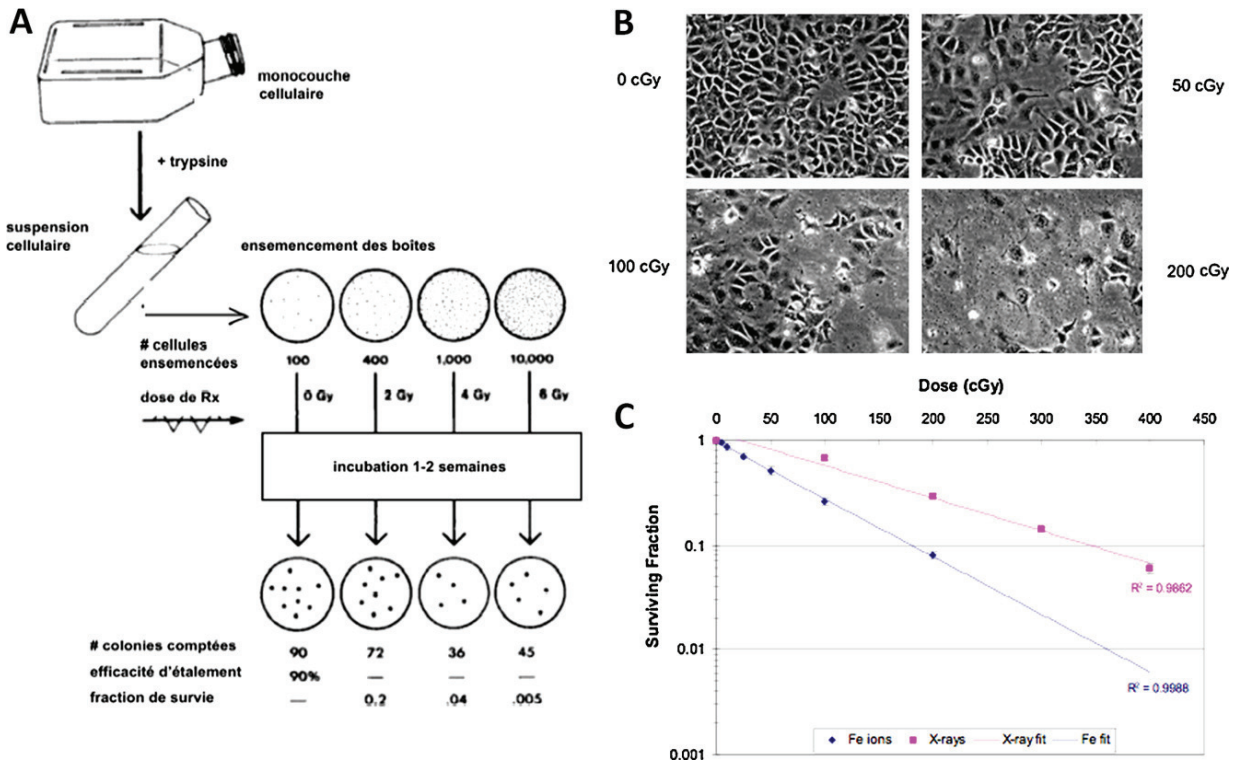


Fig. 4. (A) : méthodologie utilisée par Puck et Marcus pour tracer les courbes de survie (39); (B) illustration sur une lignée de cellules d'adénocarcinome colique lors de la NASA Space Radiation Summer School 2009 : observation des boîtes exposées à des doses croissantes d'ions fer, $E = 1 \text{ GeV/n}$, $TEL = 151 \text{ keV}/\mu\text{m}$; (C) courbes de survie comparant les ions fer aux rayons X de 250 kV et permettant de calculer graphiquement l'efficacité biologique relative. Mise en place des biomarqueurs de Fertil et Malaise.

- par la réparation de lésions de bases ;
- par la combinaison d'une cassure simple-brin et d'un dommage de base ;
- lors de la réplication (cassure simple-brin au niveau de la fourche de réplication).

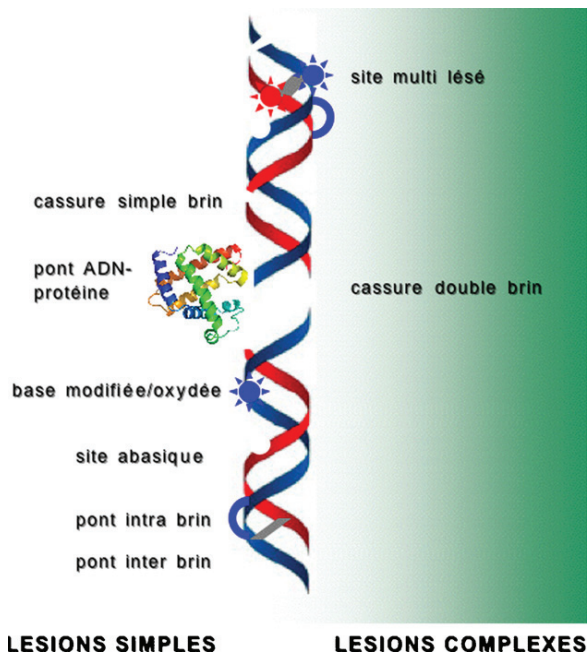


Fig. 5. Spectre des lésions radio-induites de l'ADN.

Le niveau de dose est déterminant pour les effets biologiques.

À très faible dose (autour de 1 mGy), les cassures double-brin ne sont pas signalées et les cellules irradiées sont éliminées par apoptose. Le seuil de signalisation et d'enclenchement de la réparation de ce type de lésion semble se situer autour de 5 mGy. La moitié des cassures double-brin sont réparés au bout d'une heure, alors qu'il ne faut que quelques minutes pour réparer un dommage de base.

Plutôt que le nombre absolu de cassures double-brin créées, la qualité de la réparation semble être corrélée avec la radiosensibilité. Le rythme de réparation des cassures double-brin reste invariant de 1 à 500 Gy (pas de saturation des phénomènes de réparation).

Les lésions les plus complexes et les moins réparables sont les sites multilésés. Ils consistent en un grand nombre de lésions simples (dommages aux bases, cassures simple-brin, cassures double-brin et associations ADN-protéine ou ADN/ADN), produites par une seule radiation, à proximité les unes des autres, sur une courte séquence de la molécule d'ADN (deux à dix paires de bases). Ces associations, ou *clusters*, de dommages sont la conséquence d'une accumulation de plusieurs lésions sublétales individuelles [9]. Plus ils sont complexes, moins ils sont réparables par la cellule. Non réparés, ils conduisent à un blocage de la réplication de l'ADN et à une perte de l'intégrité génétique; mal réparés, ils engendrent des cassures double-brin supplémentaires et des délétions.

Betsy Sutherland et al. ont récemment proposé une technique d'analyse in vitro de la distribution des longueurs des fragments en mettant des oligonucléotides synthétiques (ADN génomique de phage T7) irradiés par des particules de transfert d'énergie linéique croissant, en présence ou non d'un cocktail d'enzymes de réparation issues d'*Escherichia coli*. Le spectre de dommages complexes est alors analysé par électrophorèse en champ pulsé [10].

2.2.2. Les lésions complexes de l'ADN, déterminants majeurs de la létalité cellulaire radio-induite

Les cassures double-brin non réparées ont pu être associées à l'incidence des aberrations chromosomiques :

- une très bonne corrélation existe entre la formation d'aberrations chromosomiques et la mort cellulaire dans des cellules CHO exposées dans différentes périodes du cycle cellulaire. En moyenne, une aberration chromosomique engendre un événement létal. Cette corrélation est préservée lorsque les cellules sont synchronisées en phase M par du colcémide, par exemple. En outre, le fractionnement de la dose engendre un retard dans la létalité cellulaire du fait de la réparation [11];
- la conversion de cassure simple-brin en cassure double-brin au moyen d'une endonucléase multiplie par deux l'incidence des aberrations chromosomiques [12];
- le traitement des cellules par des enzymes de restriction induisant exclusivement des cassures double-brin reproduit exactement le même rendement en létalité cellulaire que l'exposition aux radiations ionisantes [13].

Le spectre des aberrations chromosomiques radio-induites recouvre les translocations, la formation d'anneaux, les inversions et les chromosomes dicentriques/acentriques conduisant à la formation de micronoyaux dont l'incidence est aussi fortement corrélée à la mort cellulaire.

Nous ne pouvons omettre les techniques de biologie moléculaire et cytogénétique qui appréhendent ces aberrations :

- PCC, ou *premature chromosome condensation*, qui permet d'étudier les chromosomes interphasiques en faisant fusionner une cellule en mitose et une cellule en G1 ;
- *banding* simple sur caryotype ;
- *fluorescence in situ hybridization* (FISH) et m-FISH (hybridation in situ par fluorescence multicolore).

Le taux de cassures double-brin résiduelles non réparées (et non leur nombre initial comme avait pu l'observer Radford en 1985 avec la technique de séparation en élution neutre) est le facteur le mieux corrélé à la radiosensibilité cellulaire. Cela semble logique dans la mesure où la cellule perd le brin matrice nécessaire pour assurer une réparation ad integrum.

Dans les systèmes bactériens, une cassure double-brin induite suffit à faire mourir la cellule avec un rendement de 100% [14].

Les cellules de rongeurs ou levures les plus radiosensibles sont toutes déficientes dans la réparation des cassures double-brin [15].

Les stimuli qui modifient la radiosensibilité cellulaire (température, transfert d'énergie linéique, hypoxie) agissent sur le nombre et la réparation d'une seule lésion : les cassures double-brin. En parallèle, dans toutes les cellules humaines, quelle que soit leur radiosensibilité, le nombre de dommages de base non réparés au bout d'une heure est invariant.

L'incorporation dans l'ADN de radionucléides induisant des cassures double-brin est très efficace dans l'induction de la mort cellulaire [16].

Ici encore les progrès des techniques de détection et de quantification des dommages radio-induits doivent être soulignés. . .

Historiquement, les technologies étaient basées sur la migration différentielle des fragments d'ADN selon leur taille. Citons l'électrophorèse en champ pulsé, le test des comètes ou les techniques d'élution en solution neutre ou alcaline. Toutefois, la résolution est limitée par la taille des fragments de sorte que cette technique ne peut explorer fidèlement toute la gamme de dose. Il n'est par ailleurs pas possible de tester la qualité de réparation.

Les tests plasmidiques ont ensuite pallié à cette limite.

L'immunofluorescence indirecte, quant à elle, est une technique plus récente et très spécifique. Il s'agit de fixer des cellules puis de bloquer des sites aspécifiques avant de mettre l'échantillon en présence d'anticorps dirigés contre une ou plusieurs protéines que l'on souhaite étudier. Après plusieurs séquences de lavage, l'échantillon est mis en présence d'un anticorps dirigé contre le premier anticorps en vue d'amplifier le signal puis observé en microscopie à fluorescence : on observe la présence localisée d'agrégats plus ou moins larges et denses de fluorescence ou foci résultant de l'hybridation des protéines avec les anticorps fluorescents spécifiques. Pour la première fois, il devient possible de détecter spécifiquement et précisément certaines protéines d'intérêt, ainsi que leur dynamique intercompartmentale. En radiobiologie, la technique fut expérimentée sur la protéine γ -H2AX impliquée dans la signalisation des cassures double-brin. L'immunofluorescence indirecte prédit l'incidence de ces radiolésions avec une excellente corrélation (40 foci/Gy) et dans une gamme de dose allant de 1 mGy à 10 Gy [17]. Il est logique d'utiliser d'autres marqueurs pour tester des hypothèses de voies de signalisation moléculaires, comme nous le reverrons par la suite.

Notons ici que le choix des techniques et des modèles est très important et leurs artefacts spécifiques peuvent révéler des corrélations artificielles. L'immunofluorescence indirecte, aussi spécifique soit-elle, a pu elle aussi mener à des conclusions erronées du fait du chevauchement des spectres de fluorescence ou *bleed-through* occasionnellement observés.

Au final, il existe un lien quantifiable par une relation mathématique simple entre les trois événements suivants : rendement en lésions complexes non réparées de l'ADN, nombre d'aberrations chromosomiques et mort cellulaire radio-induite.

Pour induire la mort d'un fibroblaste humain, $1,2 \pm 0,6$ cassures chromosomiques ou $3,5 \pm 1,5$ cassures double-brin non réparées par cellule sont nécessaires.

En 1984, Penny Jeggo a établi des lignées CHO hyperradio-sensibles (xrs 1 à 8). Leur SF2 avoisine 1% avec en outre un ralentissement de la réparation (40% de cassures double-brin non réparées à 12 heures) [18]. Puis, la comparaison a été faite avec une quarantaine de lignées fibroblastiques de patients hyperradio-sensibles et de témoins radiorésistants [19]. Trois phénotypes de réparation singuliers purent ainsi être obtenus (Fig. 6).

En résumé, moins la cellule répare, plus elle se trouve radio-sensible. Nous pouvons prédire la radiosensibilité intrinsèque à partir de la courbe de réparation, nous rapprochant ainsi davantage d'éventuels marqueurs moléculaires.

3. Radiobiologie moléculaire et la réponse intégrée de la cellule aux dommages de l'ADN radio-induits

Différentes approches permettent de disséquer une voie de signalisation moléculaire.

Historiquement, la première approche de *forward genetics* a consisté à sélectionner un phénotype d'intérêt induit par des mutations dispersées au hasard dans les cellules germinales d'individus exposés. La mutagenèse randomisée combinée au criblage génétique a pour la première fois été utilisée à grande échelle chez la drosophile afin d'élucider les mécanismes moléculaires essentiels à son développement. Ces travaux ont valu à Christiane Nüsslein-Volhard le prix Nobel de médecine en 1995. Par croisements successifs, il est possible d'obtenir un phénotype stable dans la descendance qui peut ensuite être criblé. Il s'agit d'identifier ensuite le gène d'intérêt par *mapping* et clonage positionnel chez les mutants hétérozygotes. La mutagenèse randomisée couplée au clonage positionnel est une méthode puissante car uniparamétrique : seul le produit du gène est altéré ; sa fonction peut alors être déduite du phénotype mutant. Chaque gène peut en théorie être

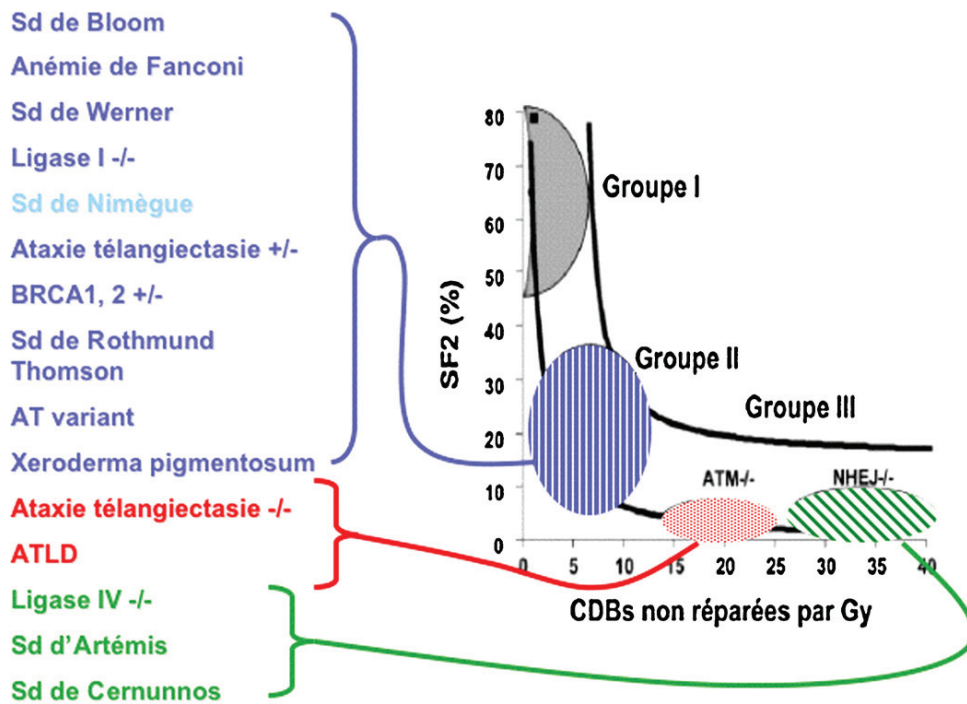


Fig. 6. Corrélation entre SF2 et cassures double-brin non réparées. Il existe une proportionnalité inverse entre la SF2 et le nombre de CDB non réparées à 24 heures. Trois grands groupes de réponses cellulaires à l'irradiation s'individualisent : les lignées radiorésistantes (groupe I), les lignées faiblement radiosensibles mais présentant une forte prédisposition au cancer (groupe II), les lignées hyperradiosensibles provenant de patients atteints d'ataxie télangiectasie ou immunodéficients [20].

touché au hasard si bien qu'il s'avère ainsi possible de générer un mutant pour chaque gène de l'espèce et d'explorer l'ensemble de la gamme phénotypique de cette espèce. Les gènes donnant le même profil d'expression sont susceptibles de coopérer dans la même voie. En revanche, les gènes d'intérêt ainsi identifiés ne peuvent être qu'essentiels, cibles d'une mutation unique non complexe. Les gènes aux fonctions redondantes ne sont en général pas identifiables par cette approche hautement chronophage, par ailleurs.

L'approche opposée dite de *reverse genetics* vise à présélectionner des gènes candidats puis à étudier le phénotype résultant de leur perte de fonction. Il s'agit au final d'une transgénèse ciblée.

Une fois le gène et son produit ciblés, il est possible de s'intéresser au phénotype perte de fonction (*silencing*), à la structure tridimensionnelle de la protéine (cristallographie), à ses propriétés biochimiques (immunoblot, clonage des domaines), aux partenaires de ces protéines (immunoprécipitation), à la répartition de cette protéine dans l'organisme du modèle d'étude (hybridation *in situ*, *green fluorescent protein* [GFP]). Aussi, des protéines plus ou moins pertinentes peuvent ainsi être placées sur le canevas hypothétique ainsi disséqué.

De tout temps, des patients porteurs de mutations constitutionnelles dans la voie d'intérêt ont été décrits et constituent un modèle d'étude de la maladie très intéressant. Certaines mutations n'ont été décrites que dans une seule famille. Levure, nématode, drosophile, zébrafish employés sont souvent phylogénétiquement éloignés de l'homme, d'où parfois un manque de pertinence émanant de voies de signalisation qualitativement ou quantitativement trop différentes; cependant, ces modèles ont à l'inverse la propriété de générer un grand nombre d'embryons et jouissent de techniques de biologie appliquée bien rodées. La souris à l'inverse possède un génome plus proche mais le temps de génération est long, la fécondité est faible, les embryons se développent *in utero* et l'organogenèse est bien plus longue et inobservable en dehors du sacrifice de la mère. Toutes ces limites la rendent moins pratique pour la mutagenèse randomisée.

3.1. Application à la réponse intégrée de la cellule aux dommages complexes de l'ADN radio-induits

Soumise à un dommage complexe dans son ADN, la cellule va réagir globalement en déclenchant une série d'événements coordonnés nommé la réponse aux dommages de l'ADN (RDA) au sein de complexes multiprotéiques. Les acteurs protéiques se placent de façon hiérarchisée et coordonnée dans cette cascade qui, au-delà de la réparation, implique de multiples fonctions cellulaires [21] (Fig. 7). Schématiquement, les dommages complexes sont :

- détectés par des protéines sentinelles ;
- amplifiés et signalés via le recrutement sur site d'autres protéines PI3 kinases ;
- des protéines effectrices vont alors générer une réponse pan cellulaire ;
- arrêt du cycle cellulaire au niveau de points de contrôle spécifiques, ce qui empêche la réplication des dommages ;
- modification de la transcription de gènes cibles et adaptation du métabolisme ;
- orientation vers la mort cellulaire (apoptose, sénescence) ;
- ou vers la survie : réparation de l'ADN.

Nous avons soulevé dans les parties précédentes le déterminisme génétique de la radiosensibilité cellulaire. Les enzymes et facteurs de transcription acteurs de cette cascade ont pu être caractérisés dès la fin des années 1980 par les deux approches que nous venons de mentionner. Les maladies de la réparation furent d'excellentes sources d'hypothèses qui ont amené à construire les courbes de réparation [22].

En 1989, Walker et al. découvrirent séparément la protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-PK) en travaillant sur le contrôle de la transcription [23]. Des extraits protéiques nucléaires de cellules HeLa pouvaient être phosphorylés durant la transcription de l'ADN et seulement en sa présence. DNA-PK se lie de façon spé-

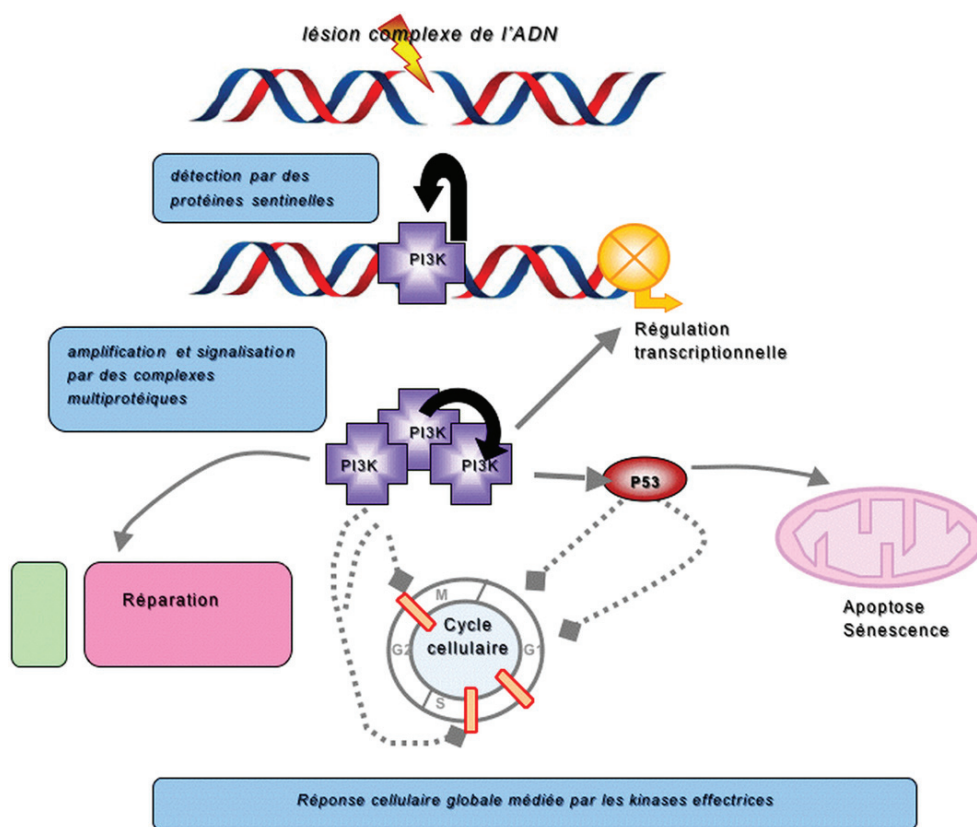


Fig. 7. La voie de réponse aux dommages de l'ADN (RDA).

cifique aux extrémités d'ADN au niveau des cassures double-brin et s'y trouve activée [24]. Au début des années 1990, seulement quelques protéines étaient connues pour se lier aux extrémités d'ADN dont Ku, un antigène auto-immun constitué de deux sous-unités de 70 et 80 kDa. Jackson découvrit alors que l'activation optimale de DNA-PK requérait que Ku vienne s'apparier avec une sous-unité catalytique de 470 kDa de DNA-PK : DNA-PKcs. Ku se lierait donc en premier aux extrémités libres d'ADN avant d'activer DNA-PKcs. En 1994, Jackson se rapprocha de Penny Jeggo qui travaillait sur les mutants de cellules eucaryotes hyperradiosensibles déficientes dans la réparation par suture. Ces cellules en particulier étaient également déficientes dans la recombinaison VDJ. Il se trouve que certains mutants sont en réalité mutés pour DNA-PKcs et d'autres pour Ku. Lees-Miller et Turner ont montré en parallèle qu'une mutation de DNA-PKcs était à l'origine de l'hyperradiosensibilité dans une tumeur humaine. Finalement, la voie de la suture commençait à être caractérisée sur le plan moléculaire, alors que de nombreux modèles de souris *knock out* pour des gènes de réparation étaient développés. Par la suite, Jackson et d'autres purifièrent et identifièrent les autres composants : DNA ligase IV, XRCC4, Cernunnos, aboutissant au modèle moléculaire accepté de la suture.

3.2. ATM, protéine sentinelle

La(les) protéine(s) détectrice(s) candidate(s) dans la cascade de réponse aux dommages de l'ADN doi(ven)t pouvoir amplifier rapidement et interagir avec un grand nombre de protéines effectrices appartenant à de nombreuses voies de signalisation au sein des différents compartiments cellulaires. Les travaux chez la levure ont conduit à la découverte par Savitsky et al., en 1995, d'*Ataxia Telangiectasia Mutated* (ATM) qui est une sérine-thréonine

kinase nucléaire très conservée à l'origine d'une cascade de phosphorylation d'autres protéines kinases [25]. Son activité augmente immédiatement après l'induction d'une lésion complexe (dédimérisation, autophosphorylation amplificatrice). Une partie des monomères reste libre dans le noyau, alors qu'une autre va se fixer sur la chromatine endommagée. Le complexe MRN (Mre11/Rad50/Nbs1), par ailleurs impliqué dans la recombinaison, est recruté au site d'ADN endommagé et recrute à son tour la protéine ATM [26]. ATM a de nombreux substrats, à commencer par H2AX, véritable gyrophare dans la signalisation des cassures double-brin. Citons en outre 53BP1, BRCA1, Chk1 et Chk2 qui interviennent dans les diverses voies de la RDA.

ATR est la cousine d'ATM. Elle va activer de façon redondante de nombreux substrats communs mais plus tardivement. Elle est plutôt impliquée ensuite dans la réparation des cassures double-brin et des dommages spécifiques induits par les ultraviolets mais également et de façon retardée dans celle des cassures double-brin [27].

ATM, DNA-PK et ATR répondent de la même manière aux dommages de l'ADN : en formant de grands complexes protéiques avec des substrats, en amplifiant la signalisation via une activité kinase avec homologie de séquence (superfamille PI3 kinase sans activité contre les phospholipides).

3.3. Voies de réparation de l'ADN admises en 2010

Il existe diverses voies de réparation des cassures double-brin :

- la recombinaison homologue dépendant de Rad-51, XRCC 2 et 3 qui reconstitue fidèlement l'information génétique par échange entre les deux chromatides sœurs homologues. Elle ne peut s'effectuer qu'en phase S ou G2 du cycle cellulaire ;

- la suture ou religation non homologue (RNH) potentiellement fautive, au décours de laquelle les deux brins sont façonnés et remis bout à bout sans échange et avec perte d'information. Ce mécanisme ne nécessite pas la présence d'une chromatide sœur et prédomine dans les cellules de mammifères. La voie rapide, dépendant du complexe Ku-DNA-PK-XRCC4, est connue de longue date. Iliakis a présenté au cours de l'Heavy Ions Therapy and Space Symposium de 2009 une voie alternative dite *backup*, de déroulement plus lent, compétitive, hautement fautive et qui s'orchestre autour de l'histone H1, DNA ligase III, XRCC1 et PARP-1. Cette voie fut découverte dans les lignées mutées pour DNA-PK et prédomine en G2 [28];
- la recombinaison non homologue dépendant de Rad-50 et Mre-11, de découverte récente, pouvant survenir en phase G1. (La recombinaison homologue est active seulement en phases S-G2/M, les cellules en G1 compétentes en suture peuvent présenter une hyperradiosensibilité et une prédisposition aux cancers par hyperrecombinaison);
- la constitution d'anneaux simple-brin (*single strand annealing*), dépendant de Rad-52 et hautement fautive et survenant en G1 est négligeable [29].

Ajoutons le cas particulier des cassures double-brin localisées dans l'hétérochromatine. Bien que moins fréquentes, elles sont lentement réparées par ATM et la kinase Artemis de cinétique plus lente. La digestion des extrémités par Artemis peut occasionner une perte d'information génétique et donc représente un risque pour la cellule [30] (Fig. 8).

Les deux principales voies distinctes et complémentaires de réparation des dommages complexes sont la recombinaison homologue et la suture. Cette dernière a déjà été développée plus haut. La recombinaison homologue a, quant à elle, été principalement étudiée chez la levure chez laquelle ce mode de réparation est exclusif.

Cette réparation n'a pas lieu au hasard dans le noyau cellulaire mais se déroule à l'interface euchromatine/hétérochromatine au niveau d'usines dites de réparation [31]. Les sites multilésés et leurs composantes sont quant à eux séparément, difficilement et lentement excisés par des glycosylases et endonucléases.

4. Impact clinique

La réparation de l'ADN est au cœur de la thérapie anticancéreuse. La radiothérapie et de nombreux médicaments de chimiothérapie sont efficaces mais également toxiques de par l'inefficacité, certes différentielle, des cellules saines et tumorales à réparer les dommages iatrogéniques de l'ADN. Les récives sont liées à une fraction de cellules clonogènes qualifiées de cellules initiateuses de tumeurs, parvenue à réparer ces lésions, survivre et proliférer en acquérant souvent au passage un nouvel avantage du fait de l'instabilité génomique. L'identification de ces cellules clonogènes avant et pendant la radiothérapie pourrait amener à prédire la radiocurabilité des lésions et donc à éventuellement escalader la dose au sein d'un volume cible biologique. Enfin, la prédisposition aux cancers chez certains individus souffrant de maladies génétiques constitutionnelles résulte de mutations dans les voies de la réponse aux dommages (en particulier complexes) de l'ADN.

4.1. Modulation de la réparation à visée curative

Plusieurs approches permettent d'améliorer la radiosensibilité tumorale in vitro. Certains médicaments semblent agir par inhibition de la réparation des lésions radio-induites par différents mécanismes que nous allons détailler. Ces médicaments radiosensibilisants sont largement utilisés dans les cancers de l'œsophage,

des bronches, des voies aérodigestives supérieures, de l'estomac, du pancréas ou les gliomes malins :

- le cisplatine induit des lésions supplémentaires dans l'ADN, monoadduits et des pontages interbrins empêchant la réparation de l'ADN et transformant des lésions réparables en dommages irréversibles et létaux. L'étoposide est un poison de la topoisomérase II (indispensable à la réplication de l'ADN) utilisé dans le traitement du cancer bronchique. Ce médicament est responsable de la création de cassures simple- et double-brin supplémentaires. Par le même mécanisme, les *D-baits* sont des petits fragments d'ADN synthétiques mimant des cassures double-brin. Ils inhibent la réparation par suture de l'ADN et perturbent les voies de signalisation. Ils radiosensibilisent les cellules in vitro et font régresser des tumeurs réputées radiorésistantes in vivo (tumeurs ORL et mélanomes xénotransplantés) [32];
- le 5-fluoro-uracile est un antimétabolite ciblant la thymidilate synthétase qui est indispensable à la synthèse de l'ADN. Par ce biais, elle bloque les mécanismes de réparation qui nécessitent une synthèse de l'ADN;
- encore moins spécifiquement, d'autres molécules et modifications de l'environnement peuvent moduler cette voie;
- la caféine inhibe la phosphorylation de p53 par ATM et ATR;
- l'hyperthermie inhibe la réparation de l'ADN (BER, b-NHEJ) [33];
- les médicaments de la famille de l'aracytine inhibent les polymérases;
- la production d'énergie peut également être la cible de molécules;
- inhibition par interférence avec le cycle cellulaire (inhibiteurs de Chk1 et Chk2);
- la transfection viciociblée d'un fragment tronqué de XRCC4 (ligand de ligase IV) peut venir saturer et inhiber de façon compétitive la voie de la suture;
- un inhibiteur sélectif de Rad51 (recombinaison homologue) fut testé in vitro et il a été montré une radiosensibilisation des cellules adénocarcinomeuses prostatiques [34] (Fig. 9).

Les molécules inhibant spécifiquement les enzymes et facteurs de transcription impliqués dans la signalisation et la réparation des dommages complexes radio-induits de l'ADN peuvent s'avérer très intéressantes. En effet, dans la plupart des cancers de l'adulte, les cellules malignes réparent plus lentement leurs dommages que les cellules saines. Au décours de la phase S, de nombreuses formes de dommages sont ainsi converties en cassures double-brin. Enfin, les cellules cancéreuses, au génome par définition instable, sont souvent déficientes dans une des voies du RDA. Elles compensent en sur-activant la voie résiduelle.

Dès 1995, Jackson s'est intéressé aux inhibiteurs du domaine PI3 kinase de DNA-PK et cribla la wortmanine et LY294002. Ces molécules inhibent également ATM et ATR qui partagent le même domaine. Elles sensibilisent les cellules contre les agents génotoxiques. Collis et al. ont montré l'efficacité de ces petits inhibiteurs non sélectifs à radiosensibiliser, d'une part, les cellules adénocarcinomeuses de côlon, branches et prostate, d'une part, mais également les fibroblastes sains, d'autre part, d'où une fenêtre thérapeutique peu favorable [35].

En 1997, Jackson a criblé une banque d'inhibiteurs plus spécifiques et l'évaluation préclinique a pu débiter. Des inhibiteurs sélectifs d'ATM (KU55933) et DNA-PK potentiellement efficaces ont d'abord été testés, puis des inhibiteurs de PARP-1 et PARP-2, connus pour être impliqués dans la réparation des cassures double-brin (*base excision repair*) et depuis peu des cassures double-brin (voie alternative de la suture) [36]. L'absence de fixation de PARP-1 doit conduire à la persistance des cassures double-brin, à leur conversion potentielle en dommages complexes en phase S et à une sensibilisation aux radiations ionisantes, aux alkylants, inhibiteurs

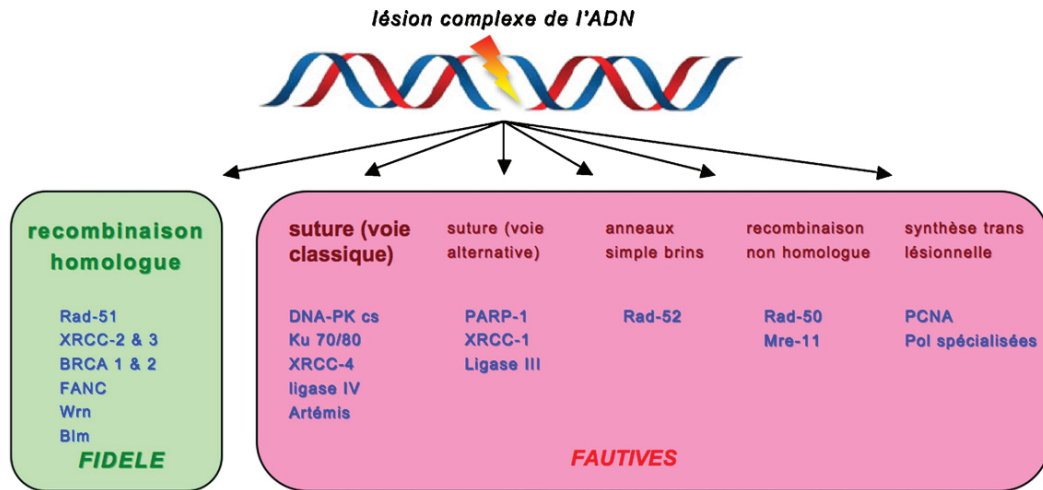


Fig. 8. Les voies de réparation des lésions complexes de l'ADN.

de topoisomérase 1 et sels de platine. En 2000, il a été montré par Moynahan et al. que les déficits en BRCA1/2 conduisaient à une mauvaise réparation des cassures double-brin via la recombinaison homologue [37]. Les cellules mutées pour BRCA se révèlent ainsi hypersensibles aux inhibiteurs de PARP [38]. L'olaparib a pu être utilisé en phase I chez 60 patients atteints de tumeur solide au-delà de toute ressource thérapeutique [39]. Il a été bien toléré et s'est montré efficace temporairement chez quelques patients (19 mutés pour BRCA). Neuf patients, tous du groupe muté, étaient en situation de régression tumorale partielle ou complète [40]. La phase I a été élargie en 2007 aux patientes souffrant de cancer de l'ovaire familial. En janvier 2009, trois essais de phase II testant l'efficacité de l'olaparib seul dans les cancers du sein ou de l'ovaire mutés pour BRCA ont été lancés. Plusieurs essais de phase I en traitement conjoint à l'encontre de cancer de type histologique différent ont débuté en parallèle [41]. Ces inhibiteurs sont actuellement en phase de recherche clinique dans les cancers du sein « triple

négatif» en association avec la chimiothérapie adjuvante (congrès de l'American Society of Clinical Oncology de 2009). D'autres essais cliniques sont en cours Outre-Atlantique en association avec le témozolomide avec ou sans radiothérapie dans les glioblastomes.

4.2. Évaluation non invasive de la radiocurabilité

Prédire la réponse thérapeutique de façon non invasive grâce à l'imagerie revient à identifier un traceur se fixant de façon sensible et spécifique aux cellules clonogènes de sorte qu'il existe un lien quantifié entre la prolifération tumorale et l'indice de captation du traceur détecté par la gamma caméra. Cet indice pouvant être évalué avant et pendant la radiothérapie. Il serait alors en théorie possible de surdoser un sous-compartiment tumoral, pas forcément anatomique, afin d'augmenter la probabilité de contrôle de la maladie d'où le concept de volume cible biologique (*biological target volume*). Plusieurs de ces traceurs sont actuellement à l'essai.

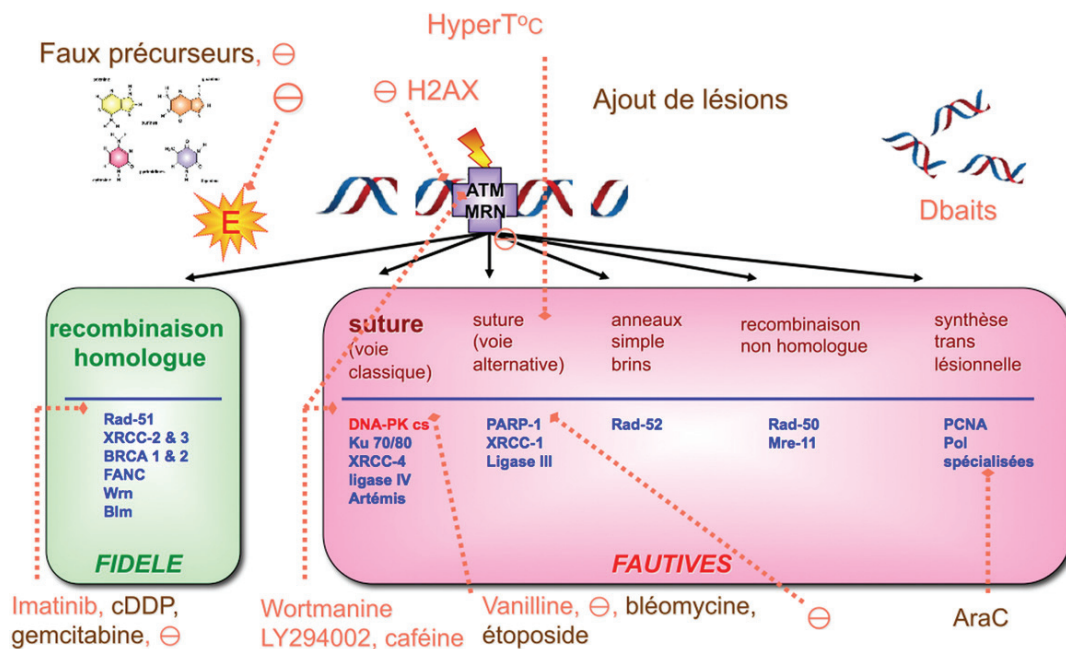


Fig. 9. Modulation de la réparation des lésions complexes de l'ADN. E : machinerie énergétique de la cellule; ⊖ : inhibiteur spécifique; en marron : chimiothérapie conventionnelle; en orange : thérapie ciblée.

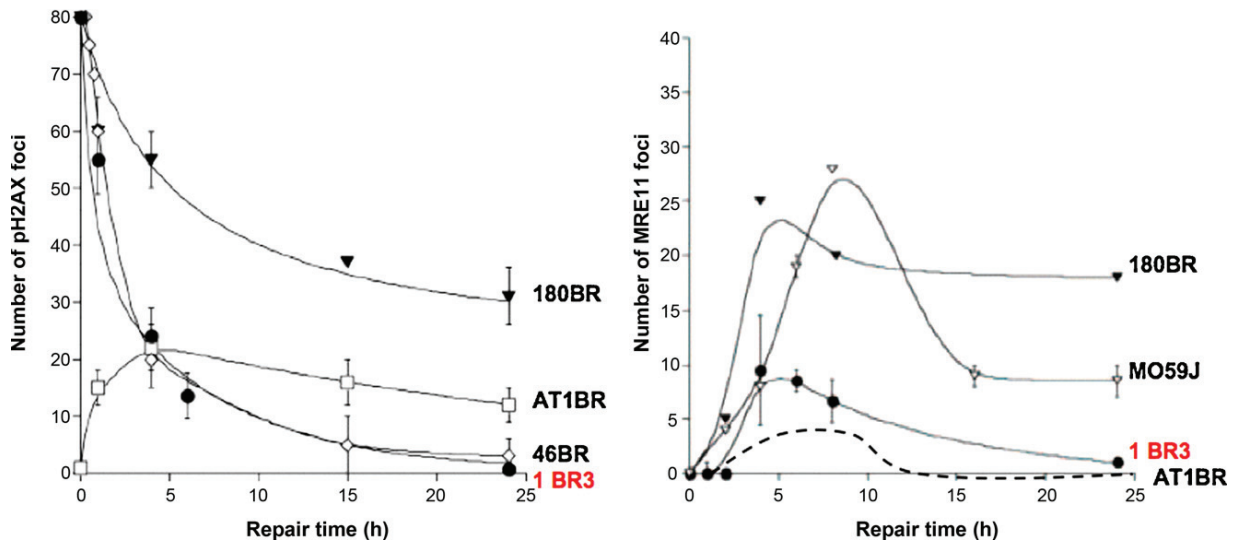


Fig. 10. Confrontation des immunofluorescences indirectes p-H2AX–MRE11 afin d’approcher la radiosensibilité individuelle (d’après Foray et al. [19]). 1BR3 : lignée radio-résistante (témoin); 46BR : LIG1 ^{-/-} (défaut en recombinaison homologue); 180BR : LIG4 ^{-/-} (défaut en suture); MO59J : DNA-PK ^{-/-} (défaut en suture); AT1BR : ATM ^{-/-} (défaut en suture et recombinaison).

Le classique 18F-fluorodésoxyglucose s’est révélé être un radio-traceur de bonne qualité dans les cancers des voies aérodigestives supérieures et bronchiques non à petites cellules. Le concept d’indice de captation a été défini grâce à ces études et a permis une adaptation thérapeutique chez les patients puisque la métabolisation du traceur est proportionnelle à la glycolyse des cellules tumorales et donc à leur prolifération [42]. Toutefois, l’évaluation de la réponse ou sa corrélation au devenir du patient ne sont pas standardisées.

Les acides aminés marqués, telle la 11C-méthyl-méthionine, se sont révélés plus sensibles dans l’évaluation de la prolifération des tumeurs encéphaliques et bronchiques [43].

Enfin, les nucléotides marqués semblent être d’excellents marqueurs de radiocurabilité chez la souris. La 18F-fluorothymidine permet d’évaluer *in vivo* la prolifération cellulaire résiduelle en cours de radiothérapie et cela indépendamment de la vascularisation. [44]. Des essais cliniques visent maintenant à utiliser ce traceur chez le patient. Le même nucléotide marqué est également testé actuellement aux États-Unis pour évaluer la réponse thérapeutique dans le cancer du sein.

4.3. Gènes de réparation et prédiction de la réponse aux radiations ionisantes : vers une adaptation des doses personnalisée...

De 5 à 15% des patients bénéficiant de radiothérapie souffrent d’effets aigus plus importants et plus précoces. Il en va de même pour les effets tardifs consécutifs dont la sévérité et la chronicité peuvent sérieusement affecter la qualité de vie alors même que le patient peut être guéri. Dès les prémices de notre discipline, les cliniciens ont espéré pouvoir un jour isoler les patients hyper-radiosensibles de la population générale avant tout traitement et d’adapter individuellement la dose.

Soulignons l’approche de Gluckman et al. qui testaient, dans les années 1980, la radiosensibilité des patients souffrant d’anémie de Fanconi, déficit constitutionnel combinant insuffisance médullaire, malformations, retard statur pondéral, susceptibilité à divers cancers et transformation en leucémie, hypersensibilité aux agents alkylants et aux radiations ionisantes d’intensité variable. Avant de leur délivrer une irradiation corporelle totale en conditionnement d’une allogreffe pour leucémie aiguë, la radiosensibilité

individuelle des patients était évaluée « en direct » en étudiant les réactions cutanées aiguës suivant un contact thérapie cutanée. Les patients détectés comme hyperradiosensibles bénéficiaient d’un conditionnement atténué [45].

La part du déterminisme génétique dans la survenue d’effets tardifs en lien avec une radiothérapie fut estimée à 80 à 90% par certains auteurs. Ainsi, le risque de télangiectasies à dix ans après une irradiation postopératoire pour un cancer du sein apparaît plus élevé chez des patientes dites hyperradiosensibles [46]. La radiosensibilité individuelle était classiquement estimée par une biopsie cutanée sur laquelle était déterminée la SF2 des fibroblastes. Plus récemment, ont été employés sans succès le taux d’aberrations chromosomiques et de micronoyaux. Toutes ces techniques ne peuvent être utilisées en routine de par leur manque de sensibilité/spécificité/reproductibilité, leur chronophage, leur caractère réducteur (une seule cellule, un seul effet). Le test d’apoptose lymphocytaire de réalisation simple permet d’extraire de la population générale des patients à risque de complications radio-induites de grade élevé. Un taux d’apoptose radio-induite CD4 et CD8 bas se trouve en effet corrélé avec un risque accru [47]. À la lumière de la caractérisation moléculaire de la réparation de l’ADN, une solution élégante semble venir de la confrontation des cinétiques d’immunofluorescence p-H2AX et MRE11 sur des biopsies de patients. Elle permet de répartir ces derniers dans les quatre groupes de radiosensibilité individuelle [48] (Fig. 10).

Les polymorphismes sont des variations d’une seule paire de base du génome, entre individus d’une même espèce. Les variations portant sur un seul nucléotide, ou *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) représentent 90% de l’ensemble des variations génétiques humaines et des SNPs avec une fréquence allélique supérieure à 1% par définition (ce qui les oppose aux mutations ponctuelles) sont présents tous les 100 à 300 paires de bases en moyenne dans le génome humain. Avec les progrès de la biologie intégrative et la technologie des micropuces, des milliers de gènes peuvent être co-étudiés sur le même échantillon [49]. Quatorze nouveaux gènes candidats impliqués dans la réparation de l’ADN ont été identifiés suite à une étude de SNPs rétrospective chez les patients traités par curiethérapie pour cancer de prostate. Il fut conclu que le polymorphisme différait selon la gravité de la toxicité tardive (LIG4, MDC1, ATM systématiquement) [50].

D'autres études de grande envergure visent à cribler les patients pour les polymorphismes de gènes candidats corrélés avec la radiosensibilité individuelle avant radiothérapie et pendant la surveillance post-thérapeutique. En comparant ces polymorphismes avec l'incidence des complications tardives de la radiothérapie, il serait en théorie possible d'isoler les patients hyperradiosensibles de la population générale et d'espérer escalader la dose chez les témoins radiorésistants. Les projets GENEPI et *genetic predictors of adverse radiotherapy effects* (Gene-PARE) ont cette ambition en se focalisant sur les variations de séquence des gènes candidats *ATM*, *SOD2*, *XRCC1*, *XRCC3*, *TGFβ1* et *RAD21* [51,52]. Des essais cliniques cherchent à corrélérer le polymorphisme des gènes de réparation de l'ADN avec le devenir de patients atteints de cancers bronchiques non à petites cellules de stade III. La même maladie fait l'objet d'un essai d'individualisation thérapeutique basée sur le niveau en ARNm des gènes *ERCC1*, *RRM1* et *BRCA1*. Enfin, un autre essai américain vise à étudier les polymorphismes en vue de prédire les effets tardifs de la radiothérapie chez des patients souffrant de cancer localisé du sein, de prostate ou du col utérin.

4.4. Prédiction de la radiocurabilité

Il est maintenant question de déterminer si cette approche peut permettre de prédire cette fois la radiocurabilité des tumeurs, c'est-à-dire si les patients isolés comme hyperradiosensibles donc à plus fort risque d'effet tardif ont un meilleur contrôle local, voire une meilleure survie.

Un travail préliminaire en ce sens a été réalisé par Ozsahin et al. chez 75 patients irradiés sur des tumeurs de voies aérodigestives supérieures. La radiosensibilité individuelle était approchée par le test d'apoptose lymphocytaire. Les sujets qui avaient avant traitement une majoration de l'apoptose médiée par les lymphocytes CD8 semblaient bénéficier d'un meilleur taux de contrôle local à deux ans que les patients témoins : respectivement, 31 % (17–45 %) contre 14 % (3–25 %), $p=0,03$. Le suivi médian était de 31 mois [53,54].

Rosenstein et al. ont confirmé ces données par une approche SNP lors du dernier congrès de l'American Society for Therapeutic Radiology and Oncology dans une plus grande cohorte de patients irradiés pour cancer de la prostate [55].

5. Conclusion

Peu après la découverte des radiations ionisantes, les praticiens, en particulier français, se sont approprié cette arme et ont rapidement cherché à en comprendre les effets sur les patients [56]. Cette radiobiologie au départ clinique a profité des progrès techniques dans les domaines de l'optique et de la biologie pour se focaliser sur la cellule et en modéliser la réponse morphologique aux radiations. Il est rapidement apparu que toutes les tumeurs et tous les tissus sains ne possédaient pas le même profil de réponse, ce qui aboutit au concept de radiosensibilité intrinsèque. Il a été à ce moment tentant de mettre au point un test simple, non invasif et reproductible susceptible de prédire la radiocurabilité. Rapidement, la réparation des dommages complexes radio-induits de l'ADN est apparue comme l'un des déterminants majeurs et non modifiables en première approche de cette radiosensibilité et une relation mathématique simple a pu relier les lésions des chromosomes et de l'ADN non réparées avec la radiosensibilité. Avec le génie génétique, les techniques de biologie moléculaire permirent de caractériser précisément les acteurs de la réparation des dommages radio-induits de l'ADN. Ceux-ci peuvent dès lors être spécifiquement modulés à l'heure des thérapies ciblées. En parallèle, l'étude préthérapeutique des fonctions des protéines de réparation devrait ouvrir la voie aux tests prédictifs en termes de

radiosensibilité individuelle et de la radiocurabilité. De nombreux essais cliniques sont en cours. L'avancée majeure réalisée en un siècle par la radiobiologie désormais moléculaire a des implications à la fois dans la thérapie antitumorale, l'immunologie, le développement, la fertilité, le vieillissement ou encore la conquête spatiale.

Conflit d'intérêt

Néant.

Remerciements

Nous remercions vivement la famille de Lucien Mallet, la Fondation de France et la SFRO. Nous saluons les intervenants du diplôme inter-universitaire (DIU) de radiobiologie–radioprotection et du master de cancérologie de l'université Paris XI, ainsi que le Dr Nicolas Foray pour ses précieux conseils.

Références

- [1] Peters LJ. The ESTRO Regaud lecture. Inherent radiosensitivity of tumor and normal tissue cells as a predictor of human tumor response. *Radiother Oncol* 1990;17:177–90.
- [2] Puck TT, Marcus PI. Action of x-rays on mammalian cells. *J Exp Med* 1956;103:653–66.
- [3] Fertil B, Malaise EP. Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1981;7:621–9.
- [4] Deacon J, Peckham MJ, Steel GG. The radioresponsiveness of human tumours and the initial slope of the cell survival curve. *Radiother Oncol* 1984;2:317–23.
- [5] Munro TR. The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of Chinese hamster fibroblasts. *Radiat Res* 1970;42:451–70.
- [6] Warters RL, Hofer KG. Radionuclide toxicity in cultured mammalian cells. Elucidation of the primary site for radiation-induced division delay. *Radiat Res* 1977;69:348–58.
- [7] Szybalski W. X-ray sensitization by halopyrimidines. *Cancer Chemother Rep* 1974;58:539–57.
- [8] Huang LC, Clarkin KC, Wahl GM. Sensitivity and selectivity of the DNA damage sensor responsible for activating p53-dependent G1 arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:4827–32.
- [9] Georgakilas AG. Processing of DNA damage clusters in human cells: current status of knowledge. *Mol Biosyst* 2008;4:30–5.
- [10] Paul S, Gros L, Laval J, Sutherland BM. Expression of the *E.coli* fpg protein in CHO cells lowers endogenous oxypurine clustered damage levels and decreases accumulation of endogenous Hprt mutations. *Environ Mol Mutagen* 2006;47:311–9.
- [11] Dewey WC, Furman SC, Miller HH. Comparison of lethality and chromosomal damage induced by x-rays in synchronized Chinese hamster cells in vitro. *Radiat Res* 1970;43:561–81.
- [12] Kaina B, van Zeeland AA, de Groot A, Natarajan AT. DNA repair and chromosomal stability in the alkylating agent-hypersensitive Chinese hamster cell line 27-1. *Mutat Res* 1990;243:219–24.
- [13] Iliakis G, Pantelias GE, Okayasu R, Seamer R. 125I-Urd-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;52:705–22.
- [14] Freifelder D. Mechanism of inactivation of coliphage T7 by x-rays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1965;54:128–34.
- [15] Kemp LM, Sedgwick SG, Jeggo PA. X-ray sensitive mutants of Chinese hamster ovary cells defective in double-strand break rejoining. *Mutat Res* 1984;132:189–96.
- [16] Iliakis G. The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. *Bioessays* 1991;13:641–8.
- [17] 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;100:5057–62.
- [18] Jeggo PA. X-ray sensitive mutants of Chinese hamster ovary cell line: radiosensitivity of DNA synthesis. *Mutat Res* 1985;145:171–6.
- [19] 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;74:551–60.
- [20] Joubert A, Foray N. Radiosensibilité intrinsèque et cassures double-brin de l'ADN dans les cellules humaines. *Cancer Radiother* 2007;11:129–42.
- [21] Jackson SP. The DNA-damage response: new molecular insights and new approaches to cancer therapy. *Biochem Soc Trans* 2009;37:483–94.
- [22] Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 2000;408:433–9.
- [23] Walker AI, Hunt T, Jackson RJ, Anderson CW. Double-stranded DNA induces the phosphorylation of several proteins including the 90 000 mol. wt. heat-shock protein in animal cell extracts. *EMBO J* 1985;4:139–45.

- [24] Jackson SP, MacDonald JJ, Lees-Miller S, Tjian R. GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase. *Cell* 1990;63:155–65.
- [25] 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;268:1749–53.
- [26] van den Bosch M, Bree RT, Lowndes NF. The MRN complex: coordinating and mediating the response to broken chromosomes. *EMBO Rep* 2003;4:844–9.
- [27] Jazayeri A, Falck J, Lukas C, Bartek J, Smith GC, Lukas J, et al. ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol* 2006;8:37–45.
- [28] Iliakis G. Backup pathways of NHEJ in cells of higher eukaryotes: cell cycle dependence. *Radiother Oncol* 2009;92:310–5.
- [29] Frankenberg-Schwager M, Gebauer A, Koppe C, Wolf H, Pralle E, Frankenberg D. Single-strand annealing, conservative homologous recombination, non-homologous DNA end joining, and the cell cycle-dependent repair of DNA double-strand breaks induced by sparsely or densely ionizing radiation. *Radiat Res* 2009;171:265–73.
- [30] Goodarzi AA, Noon AT, Jeggo PA. The impact of heterochromatin on DSB repair. *Biochem Soc Trans* 2009;37:569–76.
- [31] Costes SV, Ponomarev A, Chen JL, Nguyen D, Cucinotta FA, Barcellos-Hoff MH. Image-based modeling reveals dynamic redistribution of DNA damage into nuclear sub-domains. *PLoS Comput Biol* 2007;3:e155.
- [32] Quanz M, Berthault N, Roulin C, Roy M, Herbette A, Agrario C, et al. Small-molecule drugs mimicking DNA damage: a new strategy for sensitizing tumors to radiotherapy. *Clin Cancer Res* 2009;15:1308–16.
- [33] Kampinga HH, Dynlacht JR, Dikomey E. Mechanism of radiosensitization by hyperthermia (> or = 43 degrees C) as derived from studies with DNA repair defective mutant cell lines. *Int J Hyperthermia* 2004;20:131–9.
- [34] Collis SJ, Tighe A, Scott SD, Roberts SA, Hendry JH, Margison GP. Ribozyme minigene-mediated RAD51 down-regulation increases radiosensitivity of human prostate cancer cells. *Nucl Ac Res* 2001;29:1534–8.
- [35] Collis SJ, Khater K, DeWeese TL. Novel therapeutic strategies in prostate cancer management using gene therapy in combination with radiation therapy. *World J Urol* 2003;21:275–89.
- [36] Schreiber V, Ame JC, Dolle P, Schultz I, Rinaldi B, Fraulob V, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *J Biol Chem* 2002;277:23028–36.
- [37] Moynahan ME, Chiu JW, Koller BH, Jasin M. Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Mol Cell* 1999;4:511–8.
- [38] Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 2005;434:917–21.
- [39] Ratnam K, Low JA. Current development of clinical inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase in oncology. *Clin Cancer Res* 2007;13:1383–8.
- [40] Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *New Engl J Med* 2009;361:123–34.
- [41] Opar A. Novel anticancer strategy targets DNA repair. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:437–8.
- [42] Allal AS, Dulguerov P, Allaoua M, Haeggeli CA, El-Ghazi el A, Lehmann W, et al. Standardized uptake value of 2-[(18)F] fluoro-2-deoxy-D-glucose in predicting outcome in head and neck carcinomas treated by radiotherapy with or without chemotherapy. *J Clin Oncol* 2002;20:1398–404.
- [43] Sato N, Suzuki M, Kuwata N, Kuroda K, Wada T, Beppu T, et al. Evaluation of the malignancy of glioma using 11C-methionine positron emission tomography and proliferating cell nuclear antigen staining. *Neurosurg Rev* 1999;22:210–4.
- [44] Belkacemi Y, Tsoutsou PG, Comet B, Kerrou K, Lartigau E. Évaluation de la radiosensibilité tumorale par l'imagerie fonctionnelle et métabolique: de la recherche à l'application clinique. *Revue de la littérature. Cancer Radiother* 2006;10:124–33.
- [45] Gluckman E, Devergie A, Dutreix J. Radiosensitivity in Fanconi anaemia: application to the conditioning regimen for bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 1983;54:431–40.
- [46] Safwat A, Bentzen SM, Turesson I, Hendry JH. Deterministic rather than stochastic factors explain most of the variation in the expression of skin telangiectasia after radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;52:198–204.
- [47] 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;11:7426–33.
- [48] Joubert A, Zimmerman KM, Bencokova Z, Gastaldo J, Chavaudra N, Favaudon V, et al. DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response: at least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity? *Int J Radiat Biol* 2008;84:107–25.
- [49] Azria D, Ozsahin M, Kramar A, Peters S, Atencio DP, Crompton NE, et al. Single nucleotide polymorphisms, apoptosis, and the development of severe late adverse effects after radiotherapy. *Clin Cancer Res* 2008;14:6284–8.
- [50] Pugh TJ, Keyes M, Barclay L, Delaney A, Krzywinski M, Thomas D, et al. Sequence variant discovery in DNA repair genes from radiosensitive and radiotolerant prostate brachytherapy patients. *Clin Cancer Res* 2009;15:5008–16.
- [51] Baumann M, Holscher T, Begg AC. Towards genetic prediction of radiation responses: ESTRO's GENEPI project. *Radiother Oncol* 2003;69:121–5.
- [52] Ho AY, Atencio DP, Peters S, Stock RG, Formenti SC, Cesaretti JA, et al. Genetic predictors of adverse radiotherapy effects: the Gene-PARE project. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;65:646–55.
- [53] Ozsahin M. Do sensitive patients have sensitive tumors? ASCO annual meeting; 2005. *J Clin Oncol* 2005;5516.
- [54] Azia D, Pointreau I, Toledano A, Ozsahin M. Facteurs de radiosensibilité des tissus normaux. *Cancer Radiother* 2010;14:250–4.
- [55] Stock RG, Stone NN, Kusnetz L, Rosenstein BS. Single nucleotide polymorphism in the ATM gene correlate with PSA failure in Gleason ≤ 7 prostate cancer patients treated with low-dose rate brachytherapy. In: International journal of radiation oncology bap. 51th ASTRO annual meeting; 2009. Chicago: Elsevier; 2009. p. S106.
- [56] Cosset JM. Effets secondaires des rayonnements sur les tissus sains et organes à risque. *Cancer Radiother* 2010;14:228–31.

2.2. Article 2 : La loi de Tribondeau & Bergonié : une formule séduisante pour une première approximation

Au début du vingtième siècle, les applications médicales du radium s'élargissent sans cesse, mais c'est le domaine médical qui se révèle de loin le plus fécond. Tribondeau, bactériologiste et histologiste militaire, allia ses compétences avec Bergonié, physicien et radiothérapeute pionnier. Ils observèrent l'effet différentiel intercellulaire obtenu après irradiation fractionnée de testicules de rats. Les spermatogonies, cellules souches germinales, apparurent comme les cellules les plus radiosensibles de cet organe à même d'expliquer la stérilité obtenue après exposition à une dose faible. Les cellules cancéreuses peuvent être assimilées sur le plan morphologique à ce type cellulaire. Ils publièrent en 1906 les lois de la radiosensibilité cellulaire et tissulaire. Ces lois exprimées, selon une rigueur scientifique exemplaire, et toujours enseignées, ont servi à la compréhension de l'action des radiations ionisantes et ont jeté les bases théoriques de la RT. Elles stipulent que les cellules composant les tissus d'un organisme sont d'autant plus sensibles aux radiations ionisantes que ceux-ci agissent sur des cellules en pleine activité reproductrice, que leur avenir caryocinétique (prolifération) est plus élevée enfin que leur morphologie (différenciation) et leurs fonctions ne sont pas définitivement arrêtées. Dans la seconde partie de leur publication, les deux auteurs firent part de leur observation de cellules géantes ayant survécu à l'irradiation fractionnée. Ces "tératocytes" furent assimilés à des cellules atypiques transformées par des doses de radiations insuffisantes pour conduire à la mort cellulaire, esquissant les bases de la carcinogénèse radio induite. Les auteurs recommandèrent ainsi l'application de fortes doses et un moindre fractionnement. Bergonié avait par ailleurs souligné le facteur individuel dans la réponse tissulaire aux radiations.

Claudius Regaud dans le même temps tenta de reproduire les expérimentations des deux hommes en exposant les testicules de rats mais également d'autres tissus et d'autres espèces à une dose unique, en utilisant une méthode histologique différente. Il mit en évidence plusieurs exceptions à la loi de Bergonié eu égard au taux de prolifération, mais confirma la plus grande sensibilité des cellules

indifférenciées ainsi que l'observation des cellules monstrueuses porteuses d'aberrations chromosomiques. Regaud développa ainsi les schémas d'irradiation fractionnée toujours d'actualité.

Avec les progrès technologiques dans le domaine de la radiobiologie, la majeure partie de la loi de Tribondeau et Bergonié s'est vue confirmée. La cytogénétique a mis en évidence que les cellules des individus les plus radiosensibles et/ou susceptibles aux cancers présentent des aberrations chromosomiques bien définies. L'exposition à de faibles doses répétées peut engendrer des cellules monstrueuses chez les individus prédisposés (effet LORD). En revanche, les courbes de survie comparées de lignées tumorales et saines issues de la collection la plus importante ont en moyenne une SF2 majorée pour les premières. Le turn-over des cellules les plus prolifératives semble finalement démasquer la mort cellulaire radio induite plus rapidement sans préjuger de la radiosensibilité.

Conclusion pratique : Les tumeurs ne sont pas toujours plus radiosensibles que les tissus sains. En particulier, le taux de prolifération n'est pas toujours corrélé avec la mort cellulaire radio induite. La radiosensibilité tissulaire et la susceptibilité aux cancers radio induite sont deux notions différentes.

The law of Bergonié and Tribondeau: A nice formula for a first approximation

Guillaume Vogin^{1,2} & Nicolas Foray¹

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, CR-U1052, Groupe de Radiobiologie, Centre de Recherches en Cancérologie, Lyon, and ²Centre Alexis Vautrin, Avenue de Bourgogne, Vandoeuvre les Nancy, France

Abstract

Purpose: By extending to other animal models the experiments on irradiated rabbit testes performed by the German Albers-Schönberg and Frieben and inspired by the preliminary observations of Regaud on spermatogenesis after irradiation, Bergonié and Tribondeau established a link between radiosensitivity and proliferation as a 'law' in 1906. Although it is still popular and taken as one of the founding laws of radiation oncology, it was early considered as a 'first approximation'.

Conclusions: More than 100 years later, one tribute paid to these pioneers should be to at least avoid mixing notions like radiosensitivity, proliferation, differentiation, stem cells that they deeply contributed to define and to re-read their works in their original version in order to better understand what the technological and conceptual advances really are today.

Keywords: Radiobiology, radiosensitivity, proliferation, Regaud, Bergonié

Introduction

In 1906, Bergonié and Tribondeau published a communication that is still considered today as a founding law of radiation oncology (Bergonié and Tribondeau 1906). The law of Bergonié and Tribondeau emphasized the link between proliferation and radiosensitivity: 'X rays act on cells inasmuch as cells have a greater reproductive activity, their karyokinetic fate is longer, their morphology and function are at least definitively fixed' (Bergonié and Tribondeau 1959, 2003). Despite its popularity probably due to its simplicity, the validation of this statement has long been debated. However, a recent analysis of the archives of Claudius Regaud, one of the French pioneers of radiobiology and radiation oncology, contemporary with Bergonié and Tribondeau, suggests that in fact, Regaud's observations inspired Bergonié and Tribondeau to establish their law early considered by

Regaud as 'a first approximation' (Regaud 1925). An epistemological study of the Bergonié's and Regaud's bibliography reveals also the early confusion between radiosensitivity and cancer proneness. By reviewing the works of the three men, Bergonié, Tribondeau and Regaud, we propose here to describe the historical and scientific background in which the law of Bergonié and Tribondeau was published and to discuss its relevance with regard to the recent advances of radiation oncology (Table 1).

The historical context

Bergonié, the 'Pope' of medical electricity

Jean Alban Bergonié was born in 1857 near Bordeaux (Figure 1a). He had a solid background as a physicist and became a medical doctor in 1883 with a thesis dealing with 'the physical phenomena in muscles'. All his career was marked by both his knowledge in physics and medicine, which allowed him to develop the use of electrical currents in physiology and therapeutics and to build a great number of new devices as various as an electrical armchair to treat obesity, an electro-magnet to extract war bullets from bodies, some radiography tables, etc. (Hoerni 2007).

In 1893, Bergonié funded the *Archives d'Electricité Médicale* and assumed the charge of Editor-in-Chief for more than 30 years. Throughout this journal and his works, he became a reference for all the European electrophysiologists. Bergonié considered the discovery of X-rays by Roentgen in 1895 and that of the radium by the Curie in 1898 as no more than additional applications of electricity. Notably, he wrote in the *Archives d'Electricité Médicale* that X-rays were discovered 'simply thanks to the invention of Crookes tube some fifteen years earlier' (Hoerni 2007). However, he investigated the therapeutic and diagnostic applications of X-rays with the same passion as he did for any other branch of medical electricity. Besides, by treating numerous patients suffering

from cancers, he progressively acquired a great experience in radiation oncology. As the President of the Medical Electricity Session in the Congress of the French Society of the Advancement of Sciences, Bergonié summarized the situation of radiation oncology in 1906: 'they are two error types that may affect the medical application of X-rays: (1) the uncertainties in the assessment of radiation dose, ... and (2) the differences in the sensitivity of the patients' (Bordier and Gallimard 1906). In 1911, because of his intense participation in X-rays treatments, he suffered from dermatitis on the right index that he treated himself by diathermia (application of 500 mA during 1.5 min). His hand and thereafter his arm were amputated in 1922 and he succumbed from lung metastasis in 1925 (Hoerni 2007).

Tribondeau, a histologist in the French Navy

Little is known about Louis Tribondeau (Figure 1b). He was born in Sète (south of France) in 1872 and joined the Health Corps of the French Navy in 1890, which allowed him to travel overseas. Notably, he described the *Trichophyton*, a specific fungus of Pacific islands. He became professor of histology and microbiology in the Navy School of Bordeaux in 1902. Tribondeau was one of the first histologists who described in detail the microscopic features of tuberculous epididymitis. He also became famous because he developed staining techniques for bacteriology. In 1918, he succumbed from flu epidemic in Corfu Island (Hoerni 2007).

Claudius Regaud, a pioneer in radiobiology and radiation oncology

Born in Lyon in 1870 (i.e., 13 years after Bergonié), Claudius Regaud studied medicine in Lyon and attended the microbiology lectures organized in Paris by the Pasteur Institute (Regaud 1982) (Figure 1c). Back to Lyon in 1893, he worked every afternoon in the laboratory of Joseph Renault, an eminent histologist, known for his staining technique based on mercury. In Renault's laboratory, Regaud early improved the staining technique of Ehrlich (methylene blue) (Regaud 1895) and developed another staining technique based on ferric hematoxylin that reveals mitochondria and cytoplasm (Regaud 1901). This last technique is known today

as the technique of Regaud (Regaud 1901, 1982). With such technological advances, Renault and Regaud described the reproductive system of a number of animal models and founded the *Revue Générale d'Histologie* to which Regaud significantly contributed with clear and concise articles illustrated by his own drawings. In 1912, Regaud was appointed as the head of the Biology Section of the new Radium Institute of Paris (Marie Curie was the head of the Physics Section). He participated in World War I as the chief of Army Hospital where he became famous for organizing lectures and multidisciplinary meetings between surgeons, radiologists, hygienists, and nurses. From 1918 until 1939, he treated 1,000 cancer patients and developed fractionated radiotherapy. He died of pneumonia in December 1940 (Regaud 1982).

The scientific context

The first irradiations of Bergonié and the preliminary conclusions of Regaud

On 5 August 1895, Regaud came to Bordeaux for a neurology congress and presented his new improvements of the Ehrlich staining technique (Regaud 1895). Tribondeau or Bergonié may have attended the sessions and had probably read papers of Regaud in the *Revue Générale d'Histologie* in which the histology of the rodent reproductive system was described in detail. After the discovery of X-rays by Roentgen in December 1895, the German Albers-Schönberg and Friebe applied X-rays to animal models and studied irradiated testicles of rabbits and guinea pigs (Albers-Schönberg and Friebe 1903, Heilmann 1996, Hoerni 2007). They obtained definitive sterilization of animals by X-rays without adverse effects. Separately, Bergonié and Regaud read the German scientific literature and undertook to reproduce the experiments of Albers-Schönberg. As a physicist, Bergonié was able to build any kind of irradiation device but his knowledge in histology was limited: He met Tribondeau in Bordeaux and asked him for some help (Hoerni 2007). Between 1904 and 1905, Bergonié and Tribondeau published their first observations about irradiated testicles of rats (Bergonié and Tribondeau 1904). They emphasized the role of spermatogonia as stem cells and as the most radiosensitive cells

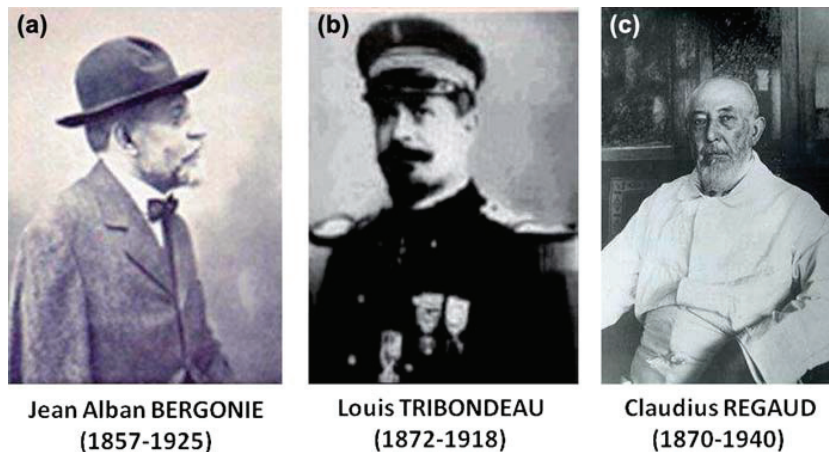


Figure 1. Photographs of (a) Bergonié, (b) Tribondeau and (c) Regaud.

of the reproductive system. However, the experiments were performed with repeated exposures to X-rays and data interpretation remained difficult. Unlike Bergonié, Regaud was an histologist and not a physicist: He was helped by Thomas Nogier, a specialist in medical physics to irradiate cells in Lyon. Regaud undertook to reproduce the experiments of Bergonié and Tribondeau but with rat models, single exposures and with his new staining technique (Regaud and Blanc 1906). In their July 1906 paper, Regaud and Blanc concluded:

In testes, the extreme sensitivity of spermatogonia to X-rays explains the immediate sterility of seminal epithelium. ... The spermatogonia being the most undifferentiated elements of seminal epithelium, it is not really worth emphasizing the interest of our observations for the action of X-rays on tissues, whether normal or pathological, and particularly on cancer. (Regaud and Blanc 1906, Regaud and Lacassagne 1927)

The communication of the 10th December 1906

In December 1906, while Regaud pursued his experiments, D'Arsonval, the father of radiofrequencies in the medical field, a member of the French Academy of Medicine, and a friend of Bergonié, presented the famous communication of Bergonié and Tribondeau (Bergonié and Tribondeau 1906). The communication itself was composed of two parts whose link did not appear necessarily obvious:

We wish to discuss: 1) the strange selectivity action of X-rays on epithelial tumors; 2) tumors induced by X-rays. All physicians have observed with the same interest mixed with surprise that radiation can kill the cells of a neoplasm while leaving the neighboring healthy tissues or those that are present in the tumor. But experiments on animals have shown that X-rays act similarly between healthy tissues. For example, in our experiments, on the testicles of the rat, we have been able to destroy the germinal cells whereas the interstitial tissue and the Sertoli syncytium remained intact. Thank to these results, it has been possible to formulate the following law: X-rays act on cells inasmuch efficiently as cells have a greater reproductive activity, their karyokinetic fate is longer, their morphology and function are at least definitively fixed. Hence, from this law it is easy to understand that roentgenisation destroys tumors without destroying healthy tissues. ... (Bergonié and Tribondeau 1959, 2003)

In the second part of their communication, Bergonié and Tribondeau spoke about some giant ('monsters') cells, also called 'teratocytes' by Bergonié which were found among irradiated healthy tissues after low and repeated doses (Bergonié and Tribondeau 1959, 2003). Bergonié linked these observations with the occurrence of epitheliomas in radiation oncology. Bergonié and Tribondeau wrote: 'when roentgenisation is not intense enough to kill cells, it can influence their further evolution. Is it not an atypical evolution, at least, the main characteristic of epitheliomas and cancer cells?'

In a last paragraph, they concluded:

... one must avoid the production of atypical mitoses by radiotherapeutic treatments. It seems pretty clear that

the practice of delivering small and repeated doses, in contradiction to the technique with less frequent and heavy doses, is more apt to produce these nondestructive irritations resulting in giant cells and probably malignant transformation. Therefore one should prefer the method of massive doses. ... When the two elements, one of which is to be destroyed by radiation therapy, have slight reproductive differences, it is very difficult to devise a technique and to determine the doses which should be used. It is in this case that monster cells and atypical mitoses are most likely to be produced after the application of X-rays. One can see from this discussion how much the histological makeup of the tumor is important to the understanding of radiation oncology. ... One must not forget that an X ray beam, even with the best determined spectrum, is very heterogeneous and that the specificity of responses of various cells to this complex radiation is still to be determined; this is the aim of our current research. (Bergonié and Tribondeau 1959, 2003)

From this very rich text in which a number of notions are mixed, four comments can be made:

- In 1906, Bergonié and Tribondeau concluded that their law was relevant for tumors but also for healthy tissues (spermatogonia vs. sertoli cells). It was this generalization that Regaud contested. However, Bergonié and Tribondeau did not consider that tumor cells are systematically more radiosensitive than healthy tissues then. Perhaps posterity has also contributed to amplify their statements. More particularly, they stated that radiation oncology may not be recommended 'in certain conditions';
- Together with Regaud, Bergonié and Tribondeau pointed out similar cellular phenomena occurring specifically after low and repeated doses (the monster cells) that they considered as a cancer initiator;
- According to the 'German school', Bergonié and Tribondeau advised a radiotherapy treatment based on few sessions of massive doses rather than several sessions of lower doses. Regaud finally preferred the daily sessions of about 2 Gy but his group in the Curie Institute debated until 1935 about the opportunity to apply doses during days, weeks or months (Lacassagne 1971);
- Histological information about tumors is absolutely required before treatment. This a clear point of agreement between Bergonié and Regaud.

These four points are discussed below.

The reply of Regaud in 1908

After July 1906, with Nogier, Lacassagne and Crémieux, Regaud systematically applied X-rays to testes, but also to skin, ovary and thymus of rabbit, mice, rat and ram (Regaud 1935). Regaud compared his data with those of Albers-Schönberg and Bergonié and in 1908 proposed some counter-examples of the law of Bergonié and Tribondeau (Regaud 1908). He concluded that the law of Bergonié and Tribondeau 'was not exact' (Figure 2). For example, he claimed that

Ligne spermatique du testicule adulte : les générations dites spermatogonies sont beaucoup plus sensibles que les générations suivantes dites auxocytes, cellules d'Ebuér et spermies.

Ligne spermatique du testicule impubère : les générations dites spermatogonies sont beaucoup moins sensibles que les générations dites spermatogonies du testicule adulte (qui pourtant leur succèdent)

La loi de Bergonié - Tribondeau est donc inexacte.

Figure 2. Handwritten notes of Regaud about his observations in 1908 from Regaud (1908). 'Adult spermatoc testes line: the generations called spermatogonia are much more sensitive than the following generations called auxocytes, Ebuér' cells and spermia. Prepubertal spermatoc testes lines: the generations called spermatogonia are much less sensitive than spermatogonia of adult testes (that are however successive). The law Bergonié - Tribondeau is therefore not exact' from Regaud (1908).

spermatogonia in young rats are less radiosensitive than in adults though their proliferation rate is similar (Regaud 1908). He claimed that Bergonié and Tribondeau had generalized his observations on rat testes 'imprudently' (Regaud and Lacassagne 1927).

Bergonié and Tribondeau did not pursue their radiobiological studies. As mentioned above, Tribondeau died in 1918 and Bergonié focused on other technological developments in medical electricity (Hoerni 2007). In 1925, Regaud did not hesitate to write about the law of Bergonié and Tribondeau in a necrological note in honour of Bergonié: 'Actual law as so many people believe it? No. But nice formula of a first approximation.' (Regaud 1925). Unlike Bergonié and Tribondeau, Regaud pursued his works about radiobiology and suggested notably that 'nuclear chromatin is the preferential target of radiation'.. 'X-rays induced cell cycle arrests'.. 'mitotic death and not apoptosis is the most frequent type of cell death' (Regaud 1908) (Table 1).

The law of Bergonié and Tribondeau today: A number of counter-examples

Still up to now, a number of oncology lectures cite the law of Bergonié and Tribondeau as a founding principle of radiotherapy stating that tumors are more radiosensitive than healthy tissues and considering that the proliferation rate is higher in tumor than in normal tissues. Throughout this erroneous statement, three kinds of errors are made:

- (1) Tumors are not necessarily more radiosensitive than normal tissues;
- (2) Proliferation rate is not necessarily correlated with cellular death after irradiation; and
- (3) Radiosensitivity and cancer susceptibility after irradiation are two different notions.

Radiosensitivity of tumor and normal cells

By clearly defining radiosensitivity as the definitive final loss of clonogenic capacity in normoxic conditions (Puck and Marcus 1956, Fertil and Malaise 1981), many authors clearly have contradicted the law of Bergonié and Tribondeau. Notably, Deschavanne and Fertil (1996) compared the surviving fraction at 2 Gy (SF2) (correlated with clinical radioresponsiveness) of a number of tumor and normal cell lines (Deschavanne and Fertil 1996). In their study, tumor cells appear to be more radioresistant on average than normal cells (SF2 = 47% vs. 29%). However, the authors stressed the fact that:

... this statement is likely to be invalid because the recruitment of nontumoral cell lines is biased toward high radiosensitivity because much research activity in that field is devoted to the study of cells defective in repair mechanisms. From a clinical point of view, the study of radiosensitive groups of tumoral cell lines is potentially less interesting than that of radioresistant lines, again resulting in a recruitment bias. Furthermore, it can be noted that the tumor cell lines exhibit a small increase in variability of radiosensitivity compared with 'normal' cell lines. (Deschavanne and Fertil 1996)

To date, it must be stressed that MO59J, a DNA-PKcs-mutated glioma shows that the same hyper-radiosensitivity as fibroblasts provided from patients suffering from ataxia telangiectasia (AT), the most radiosensitive syndrome and caused by ATM gene mutations. Similarly, some other glioblastoma cell lines show the same hyper-radioresistance as a number of radioresistant fibroblasts (Chavaudra et al. 2004, Joubert and Foray 2006).

Radiosensitivity and proliferation rate

The link between proliferation rate and radiosensitivity (defined as toxicity, cell death) is far from obvious and the law of Bergonié and Tribondeau should have been modified by: 'the faster cells proliferate, the faster cell death appears'. Besides, reviews about the Tpot (the potential doubling time parameter) have shown that the yield of cell death is clearly not correlated with proliferation rate (Begg 1995, Antognoni et al. 1998). Again, there are numerous counter-examples of the law of Bergonié and Tribondeau for this point. For example, AT fibroblasts are more radiosensitive while their in vitro proliferation rate is lower than fibroblasts from healthy patients (Foray et al. 1997). When fibroblasts are transformed by the Simian Virus 40 (SV40), cells become instable and their proliferation rate increases while they are less radiosensitive than their non-transformed counterparts (Arlett et al. 1988). Other counter-examples of the law of Bergonié and Tribondeau can be evoked, notably by studying the impact of the status of the p53 protein: Li-Fraumeni syndrome (caused by p53^{+/-} mutations) confers radioresistance but with impaired cell cycle arrests, instability and cancer proneness. Similarly, some highly proliferating tumors may be very radioresistant (Chavaudra et al. 2004).

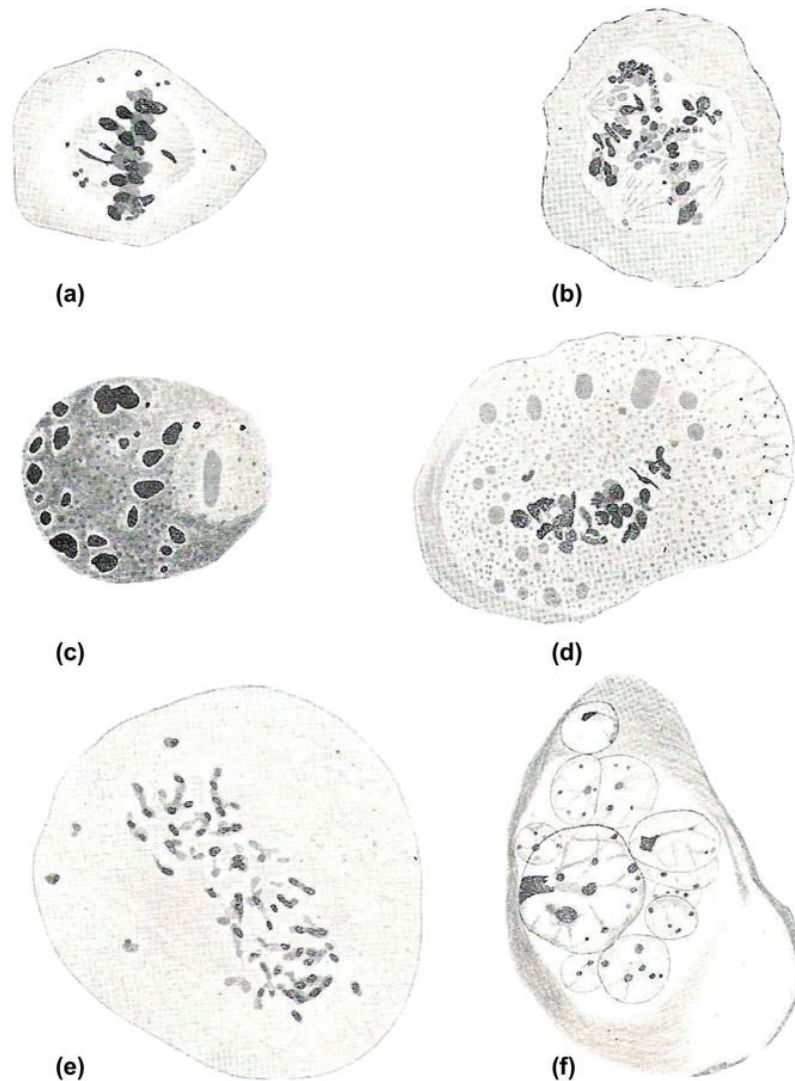


Figure 3. Representative examples of Regaud's drawing describing abnormal cells after irradiation from Regaud and Lacassagne (1927). 'Human cervix epithelioma. (a) Equatorial plate with disordered chromosomes; (b) pluripolar division; (c) and (d) degeneration and cellular death during their division; (e) disordered karyokinesis with scattered chromosomes; (f) multinucleated giant cells with unequal nuclei. Magnification: 1400.'

Radiosensitivity and radiation-induced cancer proneness

The popularity of the law of Bergonié and Tribondeau reveals up to now the confusion between radiosensitivity and radiation-induced instability and cancer. For example, to say 'In the breast it is the glandular tissue that is the most radiosensitive' (ex: https://rpop.iaea.org/RPOP/RPoP/Content/InformationFor/HealthProfessionals/1_Radiology/Mammography/MammographyScreen.htm) is not relevant with regard to the above (historical) definition of radiosensitivity: Mammary epithelial cells are not necessarily more radiosensitive than fibroblasts or lymphocytes but radiosensitivity (as definitive loss of clonogenic capacity) of mammary epithelial cells strongly depends on the individual factor, like any other tissue. Similarly, to say that thyroid of an adult is more radioresistant than that of a child is not appropriate since thyroid of AT carriers (whether adult or not) is likely to be more radiosensitive than that of a healthy child. When Regaud and Bergonié mentioned radiosensitivity, it was

clearly to describe acute tissue reactions they observed after anti-cancer radiotherapy or treatment against hypertrichosis (Arcelin 1911, Bouchacourt 1911). They clearly distinguished toxicity reactions from 'malignant transformation' that initiates cancer (Bergonié and Tribondeau 1906). Unfortunately, the confusion between these two different notions progressively led to the use of the single term of radiosensitivity. The example given above is representative of such confusion in literature but also in texts from institutions. For example, the International Commission for Radiological Protection (ICRP) have decided to increase the tissue weighting factor W_T of the breast, not because breast is more radiosensitive (in terms of loss of clonogenic capacity) but because the radiation-induced breast cancer incidence has increased (ICRP 2007). Finally, among all the points of the law of Bergonié and Tribondeau, the last sentence ('their morphology and function are at least definitively fixed') is less contestable since the impaired morphology of cells

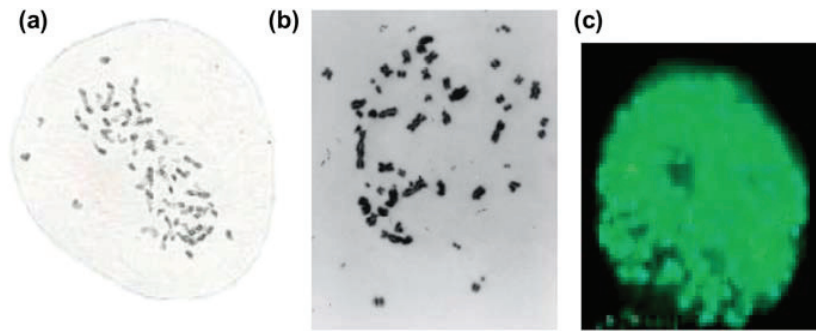


Figure 4. Aberrant cells after low and repeated doses obtained from different techniques at different periods: (a) disordered karyokinesis with scattered chromosomes reproduced from Figure 3 obtained by Regaud. (b) Rogue cells from lymphocytes from astronauts after space flight from Obe et al. (1997). (c) Representative of highly damaged cells from human mammary epithelial cells submitted to a two-screening mammography and observed with immunofluorescence against the phosphorylated forms of H2AX variant histone, from Colin et al. (2011).

may be the sign of both radiosensitivity and genomic instability. Actually, spontaneous damage, micronuclei and chromosomal aberrations are systematically observed in genetic diseases associated with radiosensitivity and cancer proneness (Jeggio and Lobrich 2007).

Common observations after low and repeated doses?

Bergonié and Regaud observed the same cellular phenomena after low and repeated doses. Even if the term 'low doses' in the drafts of Bergonié evokes some therapeutic doses likely higher than 0.5 Gy, it is not excluded that he described reactions occurring in surrounding tissues that were exposed to much lower doses than 0.5 Gy. Regaud systematically tested a large range of doses that concerned mGy and a large range of time intervals between doses. The giant ('monsters') cells called 'teratocytes' by Bergonié and 'atypical karyokineses' by Regaud are clearly not apoptosis since this phenomenon was early described and already known by radiobiologists and histologists (Regaud and Blanc 1906, Regaud and Lacassagne 1927). These monster cells typically show numerous chromosomal breaks, and are often but not systematically polyploid (Figures 3 and 4). Some of them have been described

as multiaberrant or rogue cells in cytogenetics. Rogue cells have been observed in lymphocytes of some astronauts and cosmonauts (Testard et al. 1996, Obe et al. 1997) (Figure 4). Since passages above the South Atlantic Anomaly (at 10 passages a day around the Earth) represent the major contribution to the dose, the exposure to space radiation in low Earth orbit (500 km altitude) may be modelled as approximately repetitive peaks of 25 μ Gy per day and may be considered as low and repeated doses. However, since a minority (about 10%) of astronauts and cosmonauts did show rogue cells, individual factor and other co-factors can be also evoked to explain the occurrence of rogue cells (Maalouf et al. 2011). Interestingly, more recently, we have pointed out a radiobiological effect specific to mammography exposure, the LOW and Repeated Dose (LORD) effect. By irradiating mammary epithelial cells with two successive mammographic views of 2 mGy each separated by 3 min, we observed highly damaged cells especially in patients with high family risk of cancer (Colin et al. 2011) (Figure 4). More than one century after, further investigations are needed to demonstrate the existence of radiobiological effects that would be specific to the repetition of low doses.

Table I. Summary of the understanding of the law of Tribondeau and Bergonié.

Tribondeau & Bergonié (July 1906)	The Law of Tribondeau & Bergonié (December 1906)	Regaud, 1908	To date
In testes, the extreme sensitivity of spermatogonia to X-rays explains the immediate sterility of seminal epithelium	1) X rays act on cells inasmuch efficiently as: <ul style="list-style-type: none"> - cells have a greater reproductive activity - their karyokinetic fate is longer, - their morphology and function are at least definitively fixed 	The law of Bergonié & Tribondeau was not exact	Tpot assays show that radiosensitivity is not predicted by proliferation rate Close link between genomic instability and radiosensitivity
Observation of « aberrant karyokineses » after low and repeated doses	2) Observation of « monster cells » after low and repeated doses	Many counter-examples Confirmation Confirmation	

Conclusions

Between 1895 and 1908, Albers-Schönberg, Bergonié, Regaud and Tribondeau significantly contributed to our knowledge of the biological response to radiation by studying the histological features of irradiated testes in numerous animal models. These pioneers already wanted to describe effects, propose endpoints and provide quantified data. Even if the law of Bergonié and Tribondeau linking radiosensitivity and proliferation is false, we should all recognize the efforts made by them to fight against cancer. One tribute paid to them should be to at least avoid mixing notions like radiosensitivity, proliferation, differentiation, stem cells that they deeply contributed to define and to re-read their works in their original version in order to better understand what the technological and conceptual advances really are today.

Acknowledgements

We are deeply grateful to the Regaud family and Madame Pigéard-Micault (Institut Curie, Paris) to enable us to study the Regaud's archives. We thank Madame Beaufrère for correcting our manuscript. This work is supported by the Alliance de la Vie et de la Santé (AVIESAN), the Agence Nationale de la Recherche (ANR), the Institut National du Cancer (INCa), the Centre National d'Etudes Spatiales (CNES) and the Association pour la Recherche sur l'ataxie Telangiectasie (APRAT).

Declaration of interest

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

References

- Albers-Schönberg H, Friebe A. 1903. Hodenveränderungen bei Tieren nach Röntgenbestrahlungen. München. *Medicine. Wochenschr* 50:2295.
- Antognoni P, Terry NHA, Richetti A, Luraghi R, Tordiglione M, Danova M. 1998. The predictive role of flow cytometry-derived tumor potential doubling time (Tpot) in radiotherapy: Open questions and future perspectives. *International Journal of Oncology* 12:245-256.
- Arcelin F. 1911. Existe-t-il en radiothérapie des idiosyncrasies spontanées ou acquises. *Archives d'Electricité Médicale* 10:37-61.
- Arlett CF, Green MH, Priestley A, Harcourt SA, Mayne LV. 1988. 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. *International Journal of Radiation Biology* 54:911-928.
- Begg AC. 1995. The clinical status of Tpot as a predictor? Or why no tempest in the Tpot! *International Journal of Radiation Oncology Biology and Physics* 32:1539-1541.
- Bergonié J, Tribondeau L. 1959. Interpretation of some results of radiotherapy and an attempt at determining a logical technique of treatment. *Radiation Research* 11:587-588.
- Bergonié J, Tribondeau L. 1904. Actions des rayons X sur le testicule du rat blanc. *Comptes-Rendus de la Société de Biologie (Paris)* 57:400-402.
- Bergonié J, Tribondeau L. 1906. Interprétation de quelques résultats de la radiothérapie et essai de fixation d'une technique rationnelle. *Comptes-rendus de l'Académie des Sciences (Paris)* 143:983-984.
- Bergonié J, Tribondeau L. 2003. Interpretation of some results from radiotherapy and an attempt to determine a rational treatment technique. *Yale Journal of Biology and Medicine* 76:181-182.
- Bordier H, Gallimard P. 1906. Une nouvelle unité de quantité de rayons X: l'unité I. Discussions. *Comptes-Rendus du 35ème Congrès*

- de l'Association Française pour l'Avancement des Sciences. Lyon, France. Paris: Masson.
- Bouchacourt ML. 1911. 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 du 40ème Congrès de l'Association Française pour l'Avancement des Sciences*. Dijon, France. 1911. Paris: Masson. pp 942-947.
- Chavaudra N, Bourhis J, Foray N. 2004. Quantified relationship between cellular radiosensitivity, DNA repair defects and chromatin relaxation: A study of 19 human tumour cell lines from different origin. *Radiotherapy and Oncology* 73:373-382.
- Colin C, Devic C, Noël A, Rabilloud M, Zobot M-T, Pinet-Isaac S, Giraud S, Riche B, Valette P-J, Rodriguez-Lafrasse C, et al. 2011. DNA double-strand breaks induced by mammographic screening procedures in human mammary epithelial cells. *International Journal of Radiation Biology* 87:1103-1112.
- Deschavanne PJ, Fertil B. 1996. A review of human cell radiosensitivity in vitro. *International Journal of Radiation Oncology Biology and Physics* 34:251-266.
- Fertil B, Malaise EP. 1981. Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology Biology and Physics* 7:621-629.
- Foray N, Priestley A, Alsbeih G, Badie C, Capulas EP, Arlett CF, Malaise EP. 1997. Hypersensitivity of ataxia telangiectasia fibroblasts to ionizing radiation is associated with a repair deficiency of DNA double-strand breaks. *International Journal of Radiation Oncology Biology* 72:271-283.
- Heilmann HP. 1996. Radiation oncology: Historical development in Germany. *International Journal of Radiation Oncology Biology and Physics* 35:207-217.
- Hoerni B. 2007. Jean Bergonié. Paris: Glyphe.
- International Commission of Radiological Protection (ICRP). 2007. Recommendations of the ICRP. Publication ICRP N. 103. Annual ICRP Publications, Vol. 37. Oxford: Pergamon Press.
- Jeggio PA, Lobrich M. 2007. DNA double-strand breaks: Their cellular and clinical impact? *Oncogene* 26:7717-7719.
- Joubert A, Foray N. 2006. Repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in human cells: History, progress and controversies. In: Landseer BR editor. *New research on DNA repair*. Hauppauge NY: Nova Science Publishers, Inc.
- Lacassagne A. 1971. La fondation Curie - Cinquante ans d'activité. Paris: Institut Curie.
- Maalouf M, Durante M, Foray N. 2011. Biological effects of space radiation on human cells: History, advances and outcomes. *Journal of Radiation Research (Tokyo)* 52:126-146.
- Obe G, Johannes I, Johannes C, Hallman K, Reitz G, Facius R. 1997. Chromosomal aberrations in blood lymphocytes of astronauts after long-term space flights. *International Journal of Radiation Biology* 72:727-734.
- Puck TT, Marcus PI. 1956. Action of x-rays on mammalian cells. *Journal of Experimental Medicine* 103:653-666.
- Regaud C. 1895. Sur la technique de la coloration des cellules nerveuses par le bleu de méthylène. Congrès des médecins aliénistes et neurologistes. Bordeaux, France. Bordeaux G. Gounouilhout éditeur. Bordeaux. pp 1-18.
- Regaud C. 1901. Etudes sur la structure des tubes séminifères et sur la spermatogenèse chez les mammifères. *Archives d'anatomie microscopique* 4.
- Regaud C. 1908. Travaux avec Thomas Nogier. Recherches sur les rayons X et la radiothérapie. Recherches sur les rayons X et la radiothérapie. Fonds Claudius Regaud (1905-1940). Institut Curie. Paris.
- Regaud C. 1925. Notice nécrologique sur M. Bergonié. *Bulletin de l'Académie de Médecine* 93:88-92.
- Regaud C. 1935. Notice sur les travaux scientifiques publiés de 1893 à 1935. Paris: Presses Universitaires de France.
- Regaud C, Blanc J. 1906. Action des rayons X sur les diverses générations de la lignée spermatique. Extrême sensibilité des spermatogonies à ces rayons. *Comptes-Rendus de la Société de Biologie* 61:163-165.
- Regaud C, Lacassagne A. 1927. Effets histophysiologiques des rayons de Roentgen et de Becquerel-Curie sur les tissus adultes normaux des animaux supérieurs. Fascicule I. Volume I. In: Regaud C, editor. *Radiophysiologie et Radiothérapie*. Paris: Presses Universitaires de France.
- Regaud J. 1982. Claudius Regaud. Paris: Maloine.
- Testard I, Ricoul M, Hoffschir F, Flury-Herard A, Dutrillaux B, Fedorenko B, Gerasimenko V, Sabatier L. 1996. Radiation-induced chromosome damage in astronauts' lymphocytes. *International Journal of Radiation Oncology Biology* 70:403-411.

2.3. Article 3 : Biologie des radiations : des modèles à la réalité clinique

Choisir un « modèle » d'étude fait désormais partie des premières étapes d'un programme de recherche. Pourtant, alors qu'ils peuvent être mécanistiques, moléculaires, cellulaires tissulaires ou précliniques, les modèles sont d'abord une réduction souvent déformée de la réalité. Bien qu'ils permettent quelquefois l'obtention plus rapide de résultats expérimentaux, ils cachent parfois des biais et des artéfacts qui peuvent remettre en cause la portée et le bien-fondé des conclusions des chercheurs. La biologie des radiations n'y fait pas exception. En rappelant des notions déjà anciennes et en prenant des exemples représentatifs, nous nous proposons d'aborder quelques acquis importants de la radiobiologie moderne tout en relevant quelques pièges techniques et conceptuels qui peuvent être rencontrés.

Conclusion pratique : Il existe des modes tant dans les approches expérimentales que dans le choix des moyens pour les mener. Cependant, les progrès de la biologie des radiations ne pourront être effectués sans respect d'une rigueur méthodologique qui sera la garantie du bien-fondé et de la portée des résultats obtenus. Notre équipe d'accueil a opté pour des conditions expérimentales réalistes au plus proche de la routine médicale (espèce humaine, lignées fibroblastiques non transformées, conditions d'irradiation et échelle temporelle réaliste)



Disponible en ligne sur
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



Revue générale

Biologie des radiations : avancées majeures et perspectives pour la radiothérapie

Radiation biology: Major advances and perspectives for radiotherapy

A. Joubert^{a,1}, G. Vogin^{b,c,1}, C. Devic^b, A. Granzotto^{b,c}, M. Viau^b, M. Maalouf^{b,e}, C. Thomas^b,
C. Colin^{d,f}, N. Foray^{b,1,*}

^a Société Magelis, lotissement Bel-Air, 6, rue Frédéric-Mistral, 84160 Cadenet, France

^b CR-U1052, centre de recherche en cancérologie de Lyon, Inserm, bâtiment Cheney A, 28, rue Laennec, 69008 Lyon, France

^c Centre d'hadronthérapie Étoile, 60, avenue Rockefeller, 69008 Lyon, France

^d EA3738, faculté de médecine Lyon-Sud, 69921 Oullins, France

^e Centre national d'études spatiales, 2, place Maurice-Quentin, 75039 Paris cedex 01, France

^f Service de radiologie, centre hospitalo-universitaire Lyon-Sud, chemin du Grand-Revoyet, 69495 Pierre-Bénite, France

INFO ARTICLE

Historique de l'article :

Reçu le 15 novembre 2010

Reçu sous la forme révisée

5 mai 2011

Accepté le 10 mai 2011

Disponible sur Internet le xxx

Mots clés :

Radiobiologie

Réparation de l'ADN

Radiosensibilité

Prédisposition au cancer

Keywords:

Radiobiology

DNA repair

Radiosensitivity

Cancer proneness

RÉSUMÉ

En ce début du XXI^e siècle, la radiobiologie est à un tournant majeur de son histoire. Elle doit répondre aux attentes des radiothérapeutes, des radiologues et du grand public mais sa finalité reste la même : comprendre les mécanismes moléculaires, cellulaires et tissulaires des effets létaux et carcinogènes des radiations ionisantes afin de mieux protéger les tissus sains et de développer des traitements plus efficaces contre les tumeurs. Quatre aspects majeurs de la radiobiologie qui ont marqué cette décennie seront abordés : les développements technologiques, l'importance de la signalisation et de la réparation des dommages radio-induits de l'acide désoxyribonucléique (ADN), l'impact du facteur individuel dans la réponse aux radiations et l'apport de la radiobiologie pour mieux choisir les modalités thérapeutiques innovantes comme la radiothérapie stéréotaxique extracrânienne ou la protonthérapie. Une radiobiologie translationnelle doit se développer avec l'aide des radiothérapeutes et des radiophysiciens et en facilitant les accès aux nouvelles modalités radio- et/ou chimiothérapeutiques.

© 2011 Publié par Elsevier Masson SAS pour la Société française de radiothérapie oncologique (SFRO).

SUMMARY

At the beginning of the 21st century, radiation biology is at a major turning point in its history. It must meet the expectations of the radiation oncologists, radiologists and the general public, but its purpose remains the same: to understand the molecular, cellular and tissue levels of lethal and carcinogenic effects of ionizing radiation in order to better protect healthy tissues and to develop treatments more effective against tumours. Four major aspects of radiobiology that marked this decade will be discussed: technological developments, the importance of signalling and repair of radiation-induced deoxyribonucleic acid (DNA) damage, the impact of individual factor in the response to radiation and the contribution of radiobiology to better choose innovative therapies such as protontherapy or stereotactic body radiation therapy (SBRT). A translational radiobiology should emerge with the help of radiotherapists and radiation physicists and by facilitating access to the new radio and/or chemotherapy modalities.

© 2011 Published by Elsevier Masson SAS on behalf of the Société française de radiothérapie oncologique (SFRO).

1. Introduction

Née quelques mois après la découverte des rayons X par Roentgen et les premières expériences physiologiques menées par Giesel et Pierre Curie [1], la radiobiologie est une science plus que centenaire qui subit la constante évolution conceptuelle et technique des grandes disciplines qui la composent : la physique, la

* Auteur correspondant.

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

¹ Ces trois auteurs ont contribué de façon égale.

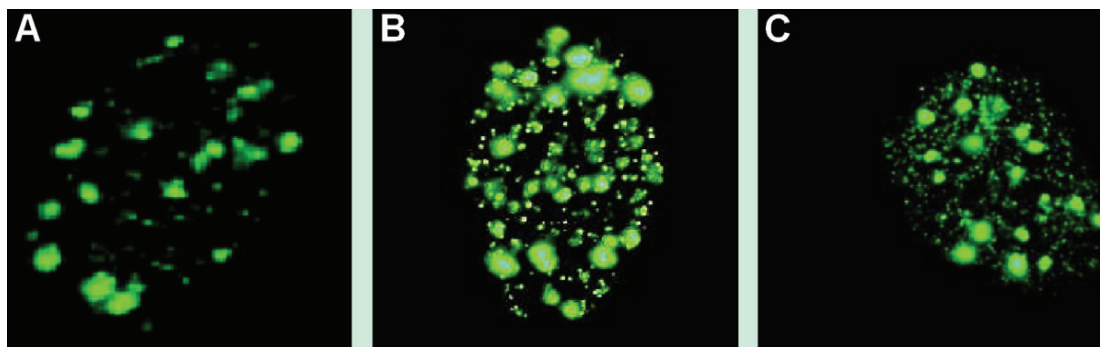


Fig. 1. Exemples représentatifs d'images de noyaux de cellules humaines irradiées contenant des foci pH2AX obtenus par immunofluorescence. Pour le même traitement (2 Gy de rayons X suivis de 4 heures de réparation), on peut bien dénombrer les foci pH2AX dans la photo de gauche (A), mais plus difficilement dans les autres photos (B, C). Le fond du noyau peut être couvert d'une coloration verte artificielle ou d'un certain nombre de petits foci dont la prise en compte dans le comptage final est un réel problème technique. La dispersion spatiale des foci illustre également l'aspect stochastique des dépôts d'énergie radio-induits.

chimie, la biologie et la médecine. Toutefois, sa finalité reste la même : comprendre les mécanismes moléculaires, cellulaires et tissulaires des effets létaux et carcinogènes des radiations ionisantes afin de mieux protéger les tissus sains et de développer des traitements plus efficaces contre les tumeurs. En ce début du XXI^e siècle, la radiobiologie est à un tournant de son histoire. Les radiobiologistes doivent en effet démêler sans cesse des mécanismes de plus en plus complexes tout en manipulant des termes si anciens qu'ils en ont souvent perdu leur définition historique. Ils doivent répondre aux besoins des radiothérapeutes qui s'interrogent sur le cas de certains patients ou la justification de tel ou tel traitement [2]. Ils doivent également répondre aux radioprotectionnistes et bientôt aux radiologues sur les effets possibles des faibles doses de radiation [3,4]. Ils doivent enfin donner des informations claires et précises au grand public au sujet de l'impact écologique d'accidents ou d'incidents nucléaires [5]. Nous développerons ici quatre aspects majeurs de la radiobiologie qui ont marqué cette décennie :

- les progrès technologiques : ils permettent aujourd'hui de détecter individuellement des dommages de l'acide désoxyribonucléique (ADN) au sein même des cellules (technique d'immunofluorescence) [6] et de mesurer l'expression ou d'étudier la séquence d'une centaine de gènes en quelques heures [7,8] ;
- l'importance de la signalisation et de la réparation des dommages radio-induits de l'ADN dans la réponse clinique aux radiations : la pharmacomodulation de la réparation permet d'augmenter la radiosensibilité des tumeurs et sa quantification permet de prédire les complications [9-11] ;
- l'impact de la susceptibilité individuelle : la connaissance de la radiosensibilité individuelle et du risque de cancer radio-induit pourraient permettre de choisir un traitement en fonction de critères radiobiologiques [12,13] ;
- les avancées pour mieux comprendre les différences radiobiologiques entre les nouvelles modalités thérapeutiques comme la radiothérapie stéréotaxique extracrânienne, la protonthérapie ou l'hadronthérapie [14-16].

2. Progrès technologiques

2.1. Visualisation des dommages de l'ADN

2.1.1. Principes

Grâce à l'essor de la biologie moléculaire et des modèles mécanistiques évoqués plus haut, il est aujourd'hui possible de « suivre » chaque protéine à travers le cytoplasme ou le noyau en utilisant les techniques d'immunofluorescence (échelle cellulaire) ou

d'immuno-histochimie (échelle tissulaire) [6]. Certaines protéines sont impliquées dans la reconnaissance et/ou la réparation des lésions radio-induites : des anticorps fluorescents peuvent donc servir de biomarqueurs pour quantifier certains dommages radio-induits de l'ADN. C'est notamment le cas des cassures double-brin de l'ADN. En 2003, Rothkamm et Löbrich ont en effet mis en évidence qu'un marquage des formes phosphorylées du variant X de l'histone H2A, (γ -H2AX) permet la mesure directe des cassures double-brin dans chaque cellule. Formant des foci nucléaires, les formes γ -H2AX sont quantitativement corrélées aux sites de cassure double-brin à raison d'un foci γ -H2AX pour une cassure [6].

2.1.2. Limites

La réalité expérimentale est cependant plus complexe puisque dans certaines conditions, notamment quand la chromatine est décondensée ou en présence de cassures simple-brin de l'ADN, l'aspect des foci nucléaires peut être très diffus, rendant ainsi difficile une quantification précise (Fig. 1). De plus, alors qu'une corrélation existe entre la fraction survivante à 2 Gy (SF2 pour *surviving fraction at 2 Gy*) et le nombre de foci γ -H2AX résiduels, l'immunofluorescence γ -H2AX ne semble toutefois pas prédire la radiosensibilité surtout quand les taux de foci γ -H2AX sont faibles [9,12].

2.1.3. Avancées et perspectives

L'immunofluorescence γ -H2AX rend possible la mesure des cassures double-brin dans une gamme de dose qui correspond aux fractions de radiothérapie (du milligray à environ 2 Gy en dose unique) alors que les techniques précédentes nécessitaient des dizaines de Gy pour que les cassures double-brin soient détectables [13]. Cette technique rend également possible la mesure des effets de faibles doses de rayons X. C'est d'ailleurs dans le même article que Rothkamm et Löbrich ont démontré la faisabilité de l'immunofluorescence γ -H2AX en tant que technique de mesure et la plus grande sévérité des cassures double-brin induites par les faibles doses de rayons X (de l'ordre du milligray) [6]. À ce titre, l'immunofluorescence γ -H2AX accélèrera sans doute les études sur les effets spécifiques aux faibles doses que le praticien peut rencontrer dans le cadre de l'imagerie portale, les examens radiographiques accompagnant la radiothérapie et les phénomènes de voisinage qui peuvent concerner des tissus sains autour de la tumeur [17,18]. Enfin, la visualisation des dommages individuels au sein même du noyau a relancé les recherches sur les aspects stochastiques des événements physiques précoces en remettant en cause la notion de dose physique à l'échelle micro- et nanoscopique mais aussi la notion de transfert linéique d'énergie et son lien avec l'efficacité biologique relative. En particulier, le rôle radio-

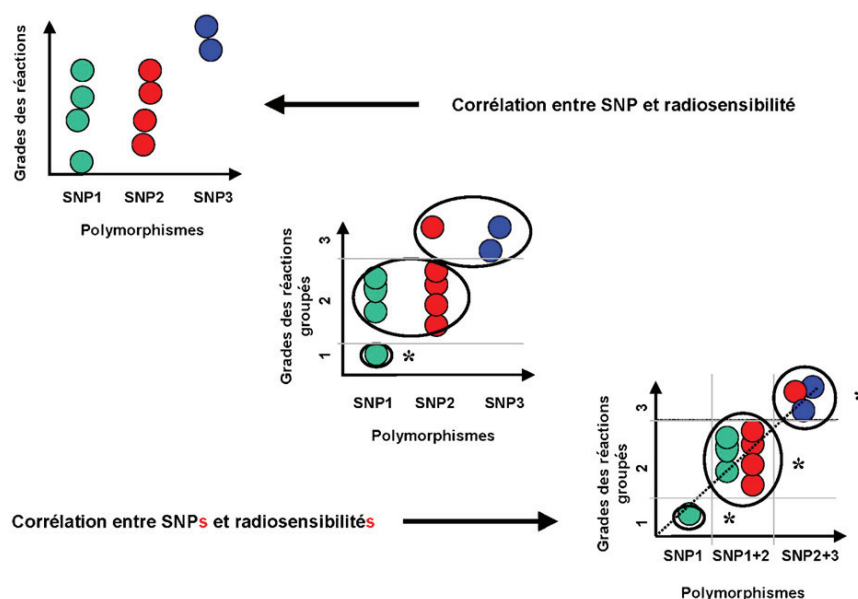


Fig. 2. Illustration schématique du changement de nature de corrélation entre la radiosensibilité (ici grade des réactions tissulaires aiguës après irradiation) et les paramètres radiobiologiques ou génétiques. Dans le cas de polymorphismes (paramètres booléens), une corrélation avec la radiosensibilité peut ne pas exister. En revanche, si l'on groupe certains niveaux de sévérité de réactions et/ou certains polymorphismes, on peut discriminer statistiquement (astérisques) certains groupes voire obtenir une relation et une corrélation significative.

biologique des électrons de très basse énergie pourrait être un des enjeux majeurs de la radiobiologie du futur [19,20]. Déclinée dans des conditions très variées, l'immunofluorescence en général est à l'origine d'avancées majeures dans la compréhension de la dynamique des interactions entre protéines impliquées en réponse aux radiations mais aussi dans l'estimation des dommages de l'ADN induits par le radiodiagnostic sur des lymphocytes ex vivo [21].

2.2. Apport de la génomique

2.2.1. Principes

Grâce aux avancées technologiques majeures dans la miniaturisation et l'analyse de masse, il est désormais possible de mesurer l'expression de gènes ou de déterminer leur(s) mutation(s) en analysant de petites quantités d'ADN ou d'acide ribonucléique (ARN) disposées sur des puces analysées par lecture optique automatisée [7].

Dans le cas de la recherche des mutations, on doit s'attarder sur les polymorphismes. Les polymorphismes concernant un simple nucléotide (SNP pour *single nucleotide polymorphism*) désignent des variations ponctuelles de paires de bases du génome sans entraîner de changement de fonctions biologiques majeures. Chaque individu est porteur de plusieurs centaines de milliers de SNP (un SNP tous les 300 paires de base). Certains polymorphismes ont été considérés comme des marqueurs possibles de la radiosensibilité et/ou de la prédisposition au cancer [22-26].

2.2.2. Limites

L'expression radio-induite des gènes doit être corrélée à la survie clonogénique si celle-ci est prédictive de la radiosensibilité. Avec le recul d'une dizaine d'années d'exploitation de données génomiques, deux constats peuvent être faits :

- la majorité des études conclut sur des données issues d'une seule dose et ne peut vérifier le lien quantitatif entre la dose, l'expression des gènes et la survie clonogénique [13];

- très peu de gènes auraient une expression qui suivrait la variation de la radiosensibilité (survie clonogénique) en fonction de la dose de radiation.

Ce serait cependant le cas de la protéine p21 (encore appelée CDKN1A) impliquée dans les processus de mort par sénescence [27]. Toutefois, dans ce cas, les porteurs de mutations hétérozygotes de p53 (syndrome Li-Fraumeni) seraient des faux positifs puisque ces mutations sont systématiquement associées à des taux d'expression de p21 très faibles.

Concernant les SNP, deux constats peuvent être faits également :

- statistiquement, leur lien avec la radiosensibilité n'est pas évident. En effet, la radiosensibilité est une notion relative et les porteurs d'un même SNP (notion booléenne) montrent généralement des réactions tissulaires radio-induites de grades différents [13];
- un seul SNP ne peut donc expliquer toute la radiosensibilité. Ainsi, de nombreux auteurs ont eu recours au regroupement des grades de sévérité des réactions tissulaires radio-induites, et/ou au regroupement de SNP différents : la relation entre SNP et complications devient alors une relation tout-ou-rien qui n'a aucune valeur statistique [26] (Fig. 2).

2.2.3. Avancées et perspectives

La quantification de l'expression génique et la détermination de SNP pourraient cependant être utiles dans la prédiction de prédispositions à certains cancers (notion moins relative que la radiosensibilité) et à leur localisation, même si, là encore, on peut douter qu'un seul SNP ou l'expression d'un seul gène radio-inductible rassemble des individus avec exactement le même tableau clinique. L'expression des gènes pourrait être par exemple prédictive de l'inflammation et de certains aspects de la réponse tissulaire aux radiations [28]. Quant aux SNP, les polymorphismes de la PARP-1 (poly-ADP ribose polymérase-1) ont été associés à certains cancers de la prostate, de l'œsophage et du poumon mais n'ont pas encore abouti à la définition de nouveaux syndromes [29].

SYNDROMES	GÈNE MUTÉ	SF2
Ataxie télangiectasie (homoz. classiques)	ATM	1-5
Syndrome Ligase IV	LIG4	2-6
Syndrome de Nimègue	NBS1	5-9
Progeria (Hutchinson-Gilford)	Lamin A	8-19
Ataxie télangiectasie (homoz. variants)	ATM	10-15
Syndrome d'Usher	Gènes USH	15-20
Syndrome de Cockayne	Gènes CS	15-30
Xeroderma pigmentosum	Gènes XP	15-30
Syndrome ATLD	MRE11	15-40
Chorée de Huntington	IT15	18-30
Syndrome de Gardner	APC ?	20-30
Syndrome de Turcot	hMSH2 ?	20-30
Anémie de Fanconi et BRCA2	Gènes FANC	20-40
Syndrome BRCA1	BRCA1	20-40
Syndrome Artémis	Artémis	20-40
.	.	.
.	.	.
Témoins radiorésistants	.	60-80

Fig. 3. Caractéristiques des principaux syndromes génétiques associés à une radiosensibilité. Les syndromes en rouge ne sont pas associés à des mutations de gènes de réparation de l'ADN. SF2: survie clonogénique à 2 Gy. D'après [13,42].

3. Importance de la réparation des cassures double-brin dans la réponse clinique aux radiations

3.1.1. Principes

Les cassures double-brin sont des événements clés de la vie cellulaire. Leur prise en charge par les systèmes biologiques, leur reconnaissance et la qualité de leur réparation conditionnent la survie et/ou la transformation cellulaire. Aujourd'hui, grâce à un développement technologique important, on peut considérer que même si d'autres organites (membranes, mitochondries) sont éventuellement impliqués indirectement dans la réponse aux radiations, leurs dommages sont créés par des doses bien plus grandes que celles nécessaires à la survenue d'effets biologiques dus aux dommages de l'ADN.

3.1.2. Limites

La très grande majorité des syndromes génétiques associés à une radiosensibilité (survie clonogénique in vitro à 2 Gy inférieure à 50%) sont également caractérisés par un défaut de réparation des cassures double-brin. Pourtant, quelques syndromes radiosensibles comme la progeria, la chorée de Huntington ou la neurofibromatose ne sont pas causés par des mutations de gènes de réparation des dommages de l'ADN (Fig. 3). Ces syndromes concernent plutôt des gènes codant pour des protéines impliquées dans la signalisation du stress et le trafic intracellulaire entre le cytoplasme et le noyau. Ainsi, pour expliquer la radiosensibilité et proposer des approches de pharmacomodulation, la réparation des cassures double-brin ne doit plus être considérée dans le seul contexte nucléaire mais aussi en relation avec des acteurs protéiques venant du cytoplasme.

3.1.3. Avancées et perspectives

En 2008, une corrélation quantitative a été mise en évidence entre la survie clonogénique à 2 Gy et le taux de cassures double-brin non réparées. La survie clonogénique à 2 Gy apparaît comme la fonction inverse du taux de cassures double-brin non réparées après 2 Gy. Cette corrélation a été obtenue avec diverses techniques de mesure des cassures double-brin et reste valable pour tous les

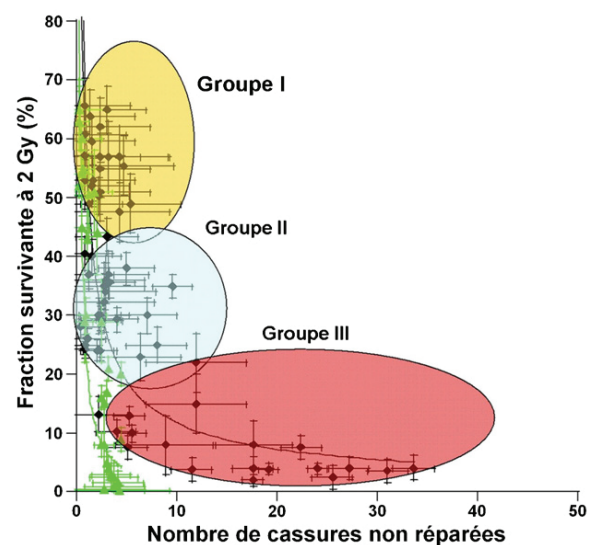


Fig. 4. Relation entre la survie clonogénique à 2 Gy et le nombre de cassures double-brin non réparées obtenus sur des fibroblastes non-transformés (losanges noirs) et lymphoblastes (ronds verts) humains issus de patients montrant divers syndromes de radiosensibilité connus ou non. Les zones de confiance représentent les trois groupes de radiosensibilité qui ont été définis dans [12]: radiorésistance (groupe I), radiosensibilité modérée et instabilité génomique (groupe II) et hyper-radiosensibilité et instabilité génomique (groupe III). Granzotto et al., manuscrit en préparation.

mammifères, pour les cellules normales ou tumorales. Une telle relation suggère que même un taux faible de cassures double-brin non réparées peut être responsable d'une radiosensibilité importante. Par exemple, passer de 0 à 4% de cassures double-brin non réparées correspond à une diminution de survie clonogénique à 2 Gy de 80% à 30% (équivalent à la radiosensibilité de patients atteints d'anémie de Fanconi, du syndrome de Bloom ou de certaines formes de neurofibromatoses) (Fig. 4). La grande majorité des patients montrant des complications post-radiothérapie (dermites, rectites, fibroses, etc.) ont un taux de cassures double-brin non réparées qui varie entre 2 et 9% (Granzotto et al., manuscrit en préparation). Les syndromes génétiques associés à des radiosensibilités exceptionnelles comme les mutations homozygotes de ATM (ataxie télangiectasique) et les mutations de la ligase IV montrent des taux de cassures double-brin non réparées qui vont de 10 à 40% [12]. Ces données nous ont permis de définir 3 groupes de radiosensibilité selon la survie clonogénique et la fonctionnalité de la réparation des cassures double-brin: groupe I: radiorésistance et faible instabilité génomique; groupe II: radiosensibilité modérée et instabilité génomique; groupe III: hyper-radiosensibilité et instabilité génomique [9,12] (Fig. 4).

Compte tenu du lien étroit entre la radiosensibilité et les défauts de réparation de l'ADN, il paraît logique de tenter d'inhiber les voies de réparation de l'ADN dans les tumeurs afin de les radiosensibiliser [30]. Ainsi, les inhibiteurs de la protéine ATM et de la réparation des cassures double-brin par suture font toujours l'objet de nombreuses études. C'est notamment le cas de drogues comme la wortmannine. Pourtant, le caractère souvent peu spécifique de ces drogues augmente d'autant les effets secondaires et limite donc leur transfert clinique systématique. En effet, tout se passe comme si moduler l'activation des gènes les plus en amont de la réponse aux cassures double-brin aboutit à une grande efficacité anti-tumorale mais aussi à une forte toxicité sur les tissus sains [31,32]. À l'inverse, la modulation de la réparation des dommages de bases, plus nombreux mais moins délétères que les cassures double-brin, pourrait avoir un intérêt thérapeutique majeur: c'est

le cas notamment des inhibiteurs de poly-ADP ribose polymérase dans le traitement de certaines pathologies comme le cancer du sein [33].

Notons enfin que l'effet synergique de certaines associations de drogues chimiothérapeutiques avec des radiations ionisantes peut être expliqué par l'inhibition de la réparation des cassures double-brin. C'est le cas du cisplatine qui, à travers les adduits qu'il crée, empêche la translocation des protéines Ku de réparation des cassures double-brin par suture le long de l'ADN [34,35]. Parallèlement à la voie chimique, on peut envisager de saturer les systèmes de réparation de l'ADN dans les tumeurs en rajoutant des leurres. C'est notamment le cas de la stratégie « *D bait* » qui consiste à saturer la réparation par suture en apportant aux cellules tumorales des quantités importantes de fragments d'ADN [36,37]. Une telle stratégie apporte ainsi à la tumeur une telle quantité de fragments d'ADN que toutes les protéines de réparation sont sollicitées : c'est la saturation du système. Les premières approches de radiobiologie translationnelle tentant d'expliquer les effets biologiques des associations radiation-inhibiteurs de tyrosine kinase ou radiation-anticorps monoclonaux montrent déjà que, même si ces agents biochimiques ont une action plutôt cytoplasmique, ils régulent certains mécanismes de réparation de l'ADN [38,39].

4. Impact de la susceptibilité individuelle

4.1.1. Principes

En France, dès 1911, avec notamment Bouchacourt, l'importance du facteur individuel dans la réponse aux radiations était une évidence [40]. Aujourd'hui, le terme général de « susceptibilité individuelle » confond les notions de radiosensibilité et d'instabilité génomique [41]. Pourtant, les aspects moléculaires et génétiques de la susceptibilité à la radiotoxicité (radiosensibilité) et au cancer (instabilité génomique radio-induite) sont différents. L'un des exemples représentatifs est le syndrome de Cockayne (mutation des gènes CS) qui est généralement associé à une photosensibilité et une radiosensibilité mais pas à une prédisposition au cancer. L'inverse est rare : on constate généralement que la prédisposition au cancer et une radiosensibilité modérée à forte sont le plus souvent liées [12].

Le spectre de réponses aux radiations est large et continu [42]. Ainsi, en parallèle des succès incontestables de la radiothérapie, on rencontre encore des décès, certes exceptionnels dus à une hyper-radiosensibilité d'origine génétique. En 2010, aux États-Unis, un patient souffrant d'une tumeur de Wilms a succombé après quelques grays d'une radiothérapie standard. L'examen post mortem a révélé qu'il était en fait porteur d'une mutation homozygote du gène *ATM* alors qu'aucun signe clinique particulier ne suggérait un tel syndrome [2].

4.1.2. Limites

La définition d'une réaction anormale se fait encore généralement en fonction de l'expérience du praticien et du contexte local [13]. La détection systématique de la radiosensibilité intrinsèque des tissus sains de chaque individu supposé recevoir un traitement radiothérapeutique n'est pas encore possible d'un point de vue organisationnel et réglementaire et d'ailleurs, doit-elle être systématique ? Toutefois, elle l'est désormais techniquement possible grâce aux nombreux appareils d'analyse microscopique de masse disponibles sur le marché. En ce qui concerne les tumeurs, les prélèvements biopsiques ne sont pas forcément possibles et l'hétérogénéité des tissus et des cellules prélevées sera toujours un facteur limitant la précision des mesures radiobiologiques.

4.1.3. Avancées et perspectives

La fréquence des maladies génétiques associées à des hyper-radiosensibilités exceptionnelles comme celle associée à l'ataxie téléangiectasique est de l'ordre de 1/100 000. Ces maladies génétiques sont généralement détectées en pédiatrie. Les cas de radiosensibilité observés en radiothérapie sont plutôt des cas associés à des radiosensibilités modérées (type groupe II) [13]. Une radiosensibilité modérée de type groupe II est justement l'un des symptômes cliniques causés par des mutations hétérozygotes de la plupart des gènes de réparation de l'ADN. Par exemple, les porteurs de mutations hétérozygotes d'*ATM* représentant environ 1 % de la population mondiale seraient légèrement plus radiosensibles que la normale et présenteraient une prédisposition au cancer élevée [43]. Concernant les tumeurs, les exemples récents du témozolomide ou des inhibiteurs de la PARP démontrent également l'impact du statut génétique de la tumeur dans le succès du traitement [44,45].

5. Apport de la radiobiologie pour mieux choisir les modalités thérapeutiques innovantes

5.1.1. Principes

La radiothérapie stéréotaxique corporelle, la tomothérapie, la radiothérapie conformationnelle, la protonthérapie ou l'hadronthérapie sont des modalités thérapeutiques innovantes qui posent des questions radiobiologiques très diverses. Les trois premières posent le problème de l'étalement de la dose, du débit de dose, du fractionnement et de la répartition spatiale des faisceaux tant pour la tumeur que pour les tissus sains [46]. Les deux dernières posent la question des réactions des tissus sains traversés et du rapport bénéfice-risque entre l'efficacité biologique relative des particules dans les tumeurs et les conséquences de l'endommagement des tissus sains traversés. Alors que la protonthérapie et l'hadronthérapie peuvent se baser sur des données radiobiologiques existantes mais qui méritent d'être amplifiées en utilisant des techniques d'investigation plus récentes [47], il faut reconnaître que la mise sur le marché du CyberKnifeTM n'a pas fait l'objet d'une littérature radiobiologique abondante sur les conséquences d'une irradiation pulsée [48,49]. Pourtant, il apparaît clair que la succession de doses d'irradiation à des intervalles de temps de l'ordre de la seconde ou la minute ne sont pas sans conséquences. Les résultats préliminaires obtenus sur des cellules humaines dans notre laboratoire indiquent que les cassures double-brin induites après 1 Gy de rayons X suivi de quelques minutes puis d'une autre exposition de 1 Gy se réparent plus lentement qu'après 2 Gy (Viau et al., manuscrit en préparation). Entre les deux doses, pendant quelques minutes, il n'y a pas de réparation significative des cassures double-brin. En revanche, la grande majorité des cassures simple-brin et surtout les dommages de bases sont normalement tous réparés. Toutefois, selon le statut génétique, si les cassures simple-brin ne sont pas ou peu réparées, leur présence décondense la chromatine et fait que l'ADN sera plus exposé à l'irradiation suivante. Certaines autres manifestations de l'effet délétère de la répétition de dose comme l'effet dit « *W* » est l'un des exemples les plus représentatifs [50,51]. À partir d'un accélérateur linéaire d'électrons des irradiations pulsées espacées par des intervalles de temps de quelques secondes à quelques minutes, le groupe de Vincent Favaudon a observé un phénomène tétraphasique et des courbes de survie clonogénique ayant la forme d'un *W* [50,51]. Enfin, l'essor de la femtochimie et des instruments liant lasers et plasma produisant des irradiations pulsées à l'échelle de la femtoseconde (10^{-15} s) en exploitant des phénomènes de résonance permettront de sonder les événements radiobiologiques beaucoup

plus précoces [52]. L'intérêt biologique de tous ces phénomènes rapides et multiphasiques induits par des doses répétées pose la question de la réponse individuelle aux modalités de radiothérapie innovante impliquant un hypo- ou un hyperfractionnement. La protonthérapie et l'hadronthérapie soulèvent des questions radiobiologiques bien différentes de celle du CyberKnife™ : l'impact de dépôts d'énergie de plus en plus denses et de plus en plus localisés ; la survenue d'effets de voisinage (dit *bystander*) qui seraient issus au passage des particules dans les tissus sains [53]. Les gros dépôts d'énergie localisés posent à nouveau le problème de la réparabilité des dommages à travers la formation des dommages complexes de l'ADN dont la mise en évidence expérimentale fait encore l'objet de discussions [54]. En ce qui concerne les effets de voisinage, ils peuvent produire, de façon différée (quelques minutes à quelques heures), des équivalents de dose de l'ordre de 10% de la dose initiale sur des cellules non ciblées par l'irradiation. Bien que les mécanismes moléculaires sous-jacents restent encore à préciser, deux explications complémentaires ont été avancées : 1) le relargage des ions Ca^{2+} après irradiation [55] ; 2) le rôle des jonctions intercellulaires [53]. L'effet *bystander* peut concerner les tumeurs comme les tissus sains et donc être impliqué dans l'efficacité thérapeutique ou d'éventuelles complications [56,57].

5.1.2. Limites

Du fait de l'absence d'intercomparaisons entre les techniques innovantes précitées, les seules limites pour les radiobiologistes sont celles de l'accès à ces nouveaux instruments d'irradiation.

5.1.3. Avancées et perspectives

Il est aujourd'hui nécessaire d'effectuer des études radiobiologiques systématiques sur chaque modalité radiothérapeutique innovante. En ce qui concerne la protonthérapie et l'hadronthérapie, les sources d'irradiation médicale disponibles au niveau national (centre de protonthérapie d'Orsay et centre Antoine-Lacassagne) ne permettent pas encore des études systématiques à grande échelle. L'utilisation d'autres sources qui étaient, à l'origine, destinées aux physiciens pourraient aider à augmenter les gammes d'énergie et le nombre de types de particules étudiées mais les débits de dose élevés que ces machines délivrent nécessitent des aménagements technologiques.

6. Conclusions

Nous avons délibérément choisi de nous focaliser sur quatre aspects majeurs de la radiobiologie qui ont marqué cette décennie : les développements technologiques, l'importance de la signalisation et de la réparation des dommages radio-induits de l'ADN, l'impact du facteur individuel dans la réponse aux radiations et l'apport de la radiobiologie pour mieux choisir les modalités thérapeutiques innovantes comme la radiothérapie par CyberKnife™ ou la protonthérapie. Alors que les trois premiers points ont bénéficié aux cliniciens comme aux scientifiques, il reste évident que pour le dernier point, les radiobiologistes ont peu anticipé les progrès technologiques de la radiothérapie. Une radiobiologie translationnelle doit donc se développer avec l'aide des radiothérapeutes et des radiophysiciens pour augmenter encore l'efficacité de ce traitement efficace qui concerne plus de la moitié des patients atteints d'un cancer.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Remerciements

Nous remercions les Professeurs M. Tubiana (Académie des Sciences), J.-L. Lagrange (CHU Henri-Mondor de Créteil), É. Lartigau (centre Oscar Lambret, Lille), J.-M. Cosset (institut Curie, Paris), J. Bourhis (institut Gustave-Roussy, Villejuif), les docteurs C. Carrie et L. Claude (centre Léon-Bérard, Lyon) ainsi que l'équipe des praticiens hospitaliers de l'hôpital cantonal de Genève pour leur concours. Nous remercions également les docteurs E.P. Malaise, V. Favaudon, D. Averbek, P. Gourmelon et L. Sabatier pour leurs conseils précieux. Ce travail a été réalisé grâce au soutien d'Électricité de France (commission de radioprotection), du Centre national d'études spatiales, de l'Agence nationale de la recherche, de l'Institut national du cancer, de l'Association pour la recherche sur l'ataxie-télangiectasie et du projet Étoile. Les auteurs de cette revue ont reçu le prix Louis-Fontaine 2008 de la fondation Rhône-Alpes Futur pour leur travail sur la prédiction des réactions suraiguës après traitement radio-chimiothérapeutique. G.V. est lauréat du prix Mallet 2009 et N.F. est lauréat de l'Académie des Sciences (prix Peyré 2009).

Références

- [1] Curie P, Becquerel H. Action physiologique des rayons du radium. C R Acad Sci 1901;82:1289.
- [2] Pietrucha BM, Heropolitanska-Pliszka E, Wakulinska A, Skopczyńska H, Gatti RA, Bernatowska E. Ataxia-telangiectasia with hyper-IgM and Wilms tumor: fatal reaction to irradiation. J Pediatr Hematol Oncol 2010;32:e28-30.
- [3] Heyes GJ, Mill AJ, Charles MW. Enhanced biological effectiveness of low energy X-rays and implications for the UK breast screening programme. Br J Radiol 2006;79:195-200.
- [4] Heyes GJ, Mill AJ, Charles MW. Mammography-oncogenecity at low doses. J Radiol Prot 2009;29:A123-132.
- [5] Sutcliffe J. Radiation a new paradigm. Societal impacts. Mutat Res 2010;687(1-2):67-72.
- [6] 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 U S A 2003;100:5057-62.
- [7] Tapio S, Hornhardt S, Gomolka M, Leszczynski D, Posch A, Thalhammer S, et al. Use of proteomics in radiobiological research: current state of the art. Radiat Environ Biophys 2010;49:1-4.
- [8] Brennan DJ, O'Connor DP, Rexhepaj E, Ponten F, Gallagher WM. Antibody-based proteomics: fast-tracking molecular diagnostics in oncology. Nat Rev Cancer 2010;10:605-17.
- [9] Joubert A, Foray N. Radiosensibilité intrinsèque et cassures double-brin de l'ADN dans les cellules humaines. Cancer Radiother 2007;11:129-42.
- [10] Foray N, Verrelle P. Réparations et réparatoses : entre modèles moléculaires et réalité clinique. Bull Cancer 2011;98:257-75.
- [11] Foray N. Aspects radiobiologiques des traitements anticancéreux par rayonnement synchrotron : bilan et perspectives. Cancer Radiother 2010;14:145-54.
- [12] Joubert A, Gamo K, Bencokova Z, Galstado 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? Int J Radiat Biol 2008;84:1-19.
- [13] Granzotto A, Joubert A, Viau M, Devic C, Maalouf M, Thomas C, et al. Réponse individuelle aux radiations ionisantes : quel(s) test(s) prédictif(s) choisir ? C R Biol 2011;334:140-57.
- [14] Thariat J, Li G, Angellier G, Marchal S, Palamini G, Rucka G, et al. Indications du CyberKnife® et essais cliniques en cours en 2009. Bull Cancer 2009;96:853-64.
- [15] Pignol JP, Meyer L, Methlin A, Wagner JP, Abbe JC, Sahel J. Radiothérapie des mélanomes oculaires : bases physiques et radiobiologiques, techniques actuelles et perspectives d'avenir. Bull Cancer Radiother 1994;81:127-42.
- [16] Blakely EA, Chang PY. Late effects from hadron therapy. Radiother Oncol 2004;73:S134-40.
- [17] Marples B, Collis SJ. Low-dose hyper-radiosensitivity: past, present, and future. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2008;70:1310-8.
- [18] Mothersill C, Seymour CB. Radiation-induced bystander effects and the DNA paradigm: an "out of field" perspective. Mutat Res 2006;597:5-10.
- [19] Goodhead DT. Energy deposition stochasticity and track structure: what about the target? Radiat Prot Dosimetry 2006;122:3-15.
- [20] Nikjoo H, Lindborg L. RBE of low-energy electrons and photons. Phys Med Biol 2010;55:R65-109.
- [21] Lohrich M, Rief N, Kuhne M, Heckmann M, Fleckenstein J, Rube C, et al. In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:8984-9.
- [22] Azria D, Ozsahin M, Kramar A, Peters S, Atencio DP, Crompton NE, et al. Single nucleotide polymorphisms, apoptosis, and the development of severe late adverse effects after radiotherapy. Clin Cancer Res 2008;14:6284-8.

- 502 [23] Werbrouck J, De Ruyck K, Duprez F, Veldeman L, Claes K, Van Eijkeren M, et al. Acute normal tissue reactions in head-and-neck cancer patients treated with
503 IMRT: influence of dose and association with genetic polymorphisms in DNA
504 DSB repair genes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009;73:1187-95.
- 505 [24] De Ruyck K, Van Eijkeren M, Claes K, Bacher K, Vral A, De Neve W, et al. TGF-
506 beta1 polymorphisms and late clinical radiosensitivity in patients treated for
507 gynecologic tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;65:1240-8.
- 508 [25] De Ruysscher D, Severin D, Barnes E, Baumann M, Bristow R, Grégoire V, et al.
509 First report on the patient database for the identification of the genetic path-
510 ways involved in patients over-reacting to radiotherapy: GENEPI-II. *Radiother*
511 *Oncol* 2010;97:36-9.
- 512 [26] Zschenker O, Raabe A, Boeckelmann IK, Borstelmann S, Szymczak S, Wellek S,
513 et al. Association of single nucleotide polymorphisms in *ATM*, *GSTP1*, *SOD2*,
514 *TGFB1*, *XPD* and *XRCC1* with clinical and cellular radiosensitivity. *Radiother*
515 *Oncol* 2010;97:26-32.
- 516 [27] Badie C, Dziwura S, Raffy C, Tsigani T, Alsbeih G, Moody J, et al. Aberrant
517 CDKN1A transcriptional response associates with abnormal sensitivity to radia-
518 tion treatment. *Br J Cancer* 2008;98:1845-51.
- 519 [28] Gervaz P, Morel P, Vozenin-Brotons MC. Molecular aspects of intestinal
520 radiation-induced fibrosis. *Curr Mol Med* 2009;9:273-80.
- 521 [29] Hennequin C, Quero L, Favaudon V. Déterminants et facteurs prédictifs pour la
522 radiosensibilité tumorale. *Cancer Radiother* 2008;12:3-13.
- 523 [30] Dutreix M, Cosset JM, Sun JS. Molecular therapy in support to radiotherapy.
524 *Mutat Res* 2010;704:182-9.
- 525 [31] Kong D, Yamori T. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors: promising drug
526 candidates for cancer therapy. *Cancer Sci* 2008;99:1734-40.
- 527 [32] Joubert A, Biston MC, Boudou C, Ravanat JL, Brochard T, Charvet AM, et al. Irra-
528 diation in presence of iodinated contrast agent results in radiosensitization of
529 endothelial cells: consequences for computed tomography therapy. *Int J Radiat*
530 *Oncol Biol Phys* 2005;62:1486-96.
- 531 [33] Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, et al. Inhibition of
532 poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J*
533 *Med* 2009;361:123-34.
- 534 [34] Turcchi JJ, Henkels KM, Zhou Y. Cisplatin-DNA adducts inhibit trans-
535 location of the Ku subunits of DNA-PK. *Nucleic Acids Res* 2000;28:
536 4634-41.
- 537 [35] Biston MC, Joubert A, Adam JF, Elleaume H, Bohic S, Charvet AM, et al.
538 Cure of Fisher rats bearing radioresistant F98 glioma treated with cis-
539 platin and irradiated with monochromatic synchrotron X-rays. *Cancer Res*
540 2004;64:2317-23.
- 541 [36] Quanz M, Berthault N, Roulin C, Roy M, Herbet A, Agrario C, et al. Small-
542 molecule drugs mimicking DNA damage: a new strategy for sensitizing tumors
543 to radiotherapy. *Clin Cancer Res* 2009;15:1308-16.
- 544 [37] Quanz M, Chassoux D, Berthault N, Agrario C, Sun JS, Dutreix M. Hyperacti-
545 vation of DNA-PK by double-strand break mimicking molecules disorganizes
546 DNA damage response. *PLoS One* 2009;4:e6298.
- 547 [38] Li HF, Kim JS, Waldman T. Radiation-induced Akt activation modulates radio-
548 resistance in human glioblastoma cells. *Radiat Oncol* 2009;4:43.
- [39] Kriegs M, Kasten-Pisula U, Rieckmann T, Holst K, Saker J, Dahm-Daphi
549 J, et al. The epidermal growth factor receptor modulates DNA double-
550 strand break repair by regulating non-homologous end-joining. *DNA Repair*
551 (Amst);9:889-97. Q4 552
- [40] Bouchacourt ML. Sur la différence de sensibilité aux rayons de Roentgen de
553 la peau des différents sujets, et, sur le même sujet des différentes régions du
554 corps. In: SplAd, editor. Sciences. Paris: Masson; 1911. p. 942-7. 555
- [41] Scott D. Chromosomal radiosensitivity low penetrance predisposition to can-
556 cer. *Cytogenet Genome Res* 2004;104:365-70. 557
- [42] Deschavanne PJ, Fertil B. A review of human cell radiosensitivity in vitro. *Int J*
558 *Radiat Oncol Biol Phys* 1996;34:251-66. 559
- [43] Swift M, Morrell D, Massey RB, Chase CL. Incidence of cancer in 161 families
560 affected by ataxia-telangiectasia. *N Engl J Med* 1991;325:1831-6. 561
- [44] Telli ML, Ford JM. PARP inhibitors in breast cancer. *Clin Adv Hematol Oncol*
562 8:629-35. 563
- [45] Fukushima T, Takeshima H, Kataoka H. Anti-glioma therapy with temozolomide
564 and status of the DNA-repair gene MGMT. *Anticancer Res* 2009;29:4845-54. 565
- [46] Foray N, Fertil B, Alsbeih MG, Badie C, Chavaudra N, Iliakis G, et al. Dose-rate
566 effect on radiation-induced DNA double-strand breaks in the human fibroblast
567 HF19 cell line. *Int J Radiat Biol* 1996;69:241-9. 568
- [47] Skarsgard LD. Radiobiology with heavy charged particles: a historical review.
569 *Phys Med* 1998;14:1-19. 570
- [48] Murphy MJ, Lin PS, Ozhasoglu C. Intra-fraction dose delivery timing during
571 stereotactic radiotherapy can influence the radiobiological effect. *Med Phys*
572 2007;34:481-4. 573
- [49] Thariat J, Marcié S, Marcy PY, Trimaud R, Angellier G, Mammar H, et al. La
574 radiothérapie stéréotaxique avec Cyberknife® : aspects pratiques et dévelop-
575 pements technologiques récents. *Bull Cancer* 2010;97:807-18. 576
- [50] Ponette V, Giocanti N, Tourbez H, Balosso J, Hennequin C, Favaudon V. Pulse
577 exposure to ionizing radiation elicits rapid changes in cellular radiosensitivity.
578 *C R Acad Sci III* 1996;319:505-9. 579
- [51] Ponette V, Le Péchoux C, Deniaud-Alexandre E, Fernet M, Giocanti N, Tour-
580 bez H, et al. Hyperfast early cell response to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol*
581 2000;76:1233-43. 582
- [52] Gauduel YA. Spatio-temporal radiation biology: an emerging transdisciplinary
583 domain. Preface. *Mutat Res* 2010;704:1. 584
- [53] Mothersill CE, Moriarty MJ, Seymour CB. Radiotherapy and the potential exploi-
585 tation of bystander effects. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;58:575-9. 586
- [54] Boucher D, Testard I, Averbeck D. Low levels of clustered oxidative DNA damage
587 induced at low and high LET irradiation in mammalian cells. *Radiat Environ*
588 *Biophys* 2006;45:267-76. 589
- [55] Szumiel I, Sochanowicz B, Buraczewska I. Ca²⁺ mobilization is related to the
590 lethal effect of X-irradiation in L5178Y cells. *Int J Radiat Biol* 1990;58:125-31. 591
- [56] Mothersill C, Seymour C. Radiation-induced bystander effects, carcinogenesis
592 and models. *Oncogene* 2003;22:7028-33. 593
- [57] Mothersill C, Seymour C. Radiation-induced bystander effects and adap-
594 tive responses—the Yin and Yang of low-dose radiobiology? *Mutat Res*
595 2004;568:121-8. 596

2.4. Article 4 : Réponse individuelle aux radiations ionisantes : quel(s) test(s) prédictif(s) choisir ?

Au moment où fut découvert avec la méthode des colonies le concept de radiosensibilité intrinsèque, et par la même son déterminisme génétique, il fut permis d'envisager que la réponse tumorale et tissulaire aux radiations ionisantes pouvait être prédite. De nombreux groupes ont ainsi cherché à déterminer le substratum biologique de cette radiosensibilité intrinsèque pour développer des tests prédictifs, de radiosensibilité individuelle en particulier.

La distribution continue de la radiosensibilité individuelle dans la population fait écho au continuum des réactions tissulaires observées en pratique. Certains patients peuvent présenter des toxicités limitantes pendant ou après une RT menée sans déviation. La dichotomisation effets précoces/tardifs peut apparaître arbitraire et dénuée de sens face au continuum des réactions tissulaires dans le temps. L'évaluation des toxicités radio induites est essentielle pour l'appréciation du service rendu. Toutefois elle est encore marginale, la multiplicité des échelles de gravité n'aidant pas.

La notion de radiosensibilité individuelle rapidement mise en évidence au début du vingtième siècle sombra sous la pression de la standardisation des procédures diagnostiques et thérapeutiques en pratique médicale. La définition et la quantification de la radiosensibilité intrinsèque autour du concept de perte de capacité proliférative fut à l'origine du succès des tests prédictifs clonogéniques qui, bien que fondamentaux, sont de réalisation trop lourde en routine. Passées au crible des biologistes moléculaires et au moyen de modèles expérimentaux souvent non réalistes, les variations interindividuelles de la réponse cellulaire aux radiations donnèrent lieu au développement de tests voués à l'échec bien que fournissant souvent des résultats rapides mais souvent non quantitatifs. La mesure de l'expression radio induite ou la détermination de SNPs souvent effectuées à partir de lymphocytes présentent des avantages de rapidité d'acquisition de données, mais la littérature actuelle suggère qu'ils ne prédisent pas suffisamment la relation dose-effet ainsi que les réactions les plus sévères qui surviennent généralement sur les autres tissus. Notons également que l'usage des lymphocytes peut entraîner des biais dans la prédiction des réactions radio induites des tissus conjonctifs, minoritairement concernés par l'apoptose radio induite, mais pourtant au cœur de la physiopathologie

des séquelles. En revanche les tests évaluant la mort mitotique reflétée par certaines anomalies cytogénétiques, elles-mêmes proportionnelles au nombre de CDB non réparées à 24h trouvent tout leur intérêt dans notre démarche. Les mutations homozygotes des protéines de réparation de l'ADN sont associées à la plus forte radiosensibilité syndromique. L'analyse en immunofluorescence permet l'analyse simultanée de la réparation, de la signalisation et des micronoyaux

Conclusion pratique : Au rebours des études mono géniques et de biologie intégrative, le laboratoire d'accueil a délibérément choisi d'adopter une démarche centrée sur la fonctionnalité de la réparation des CDB. L'enjeu est également d'explorer le plus grand spectre possible de radiosensibilité humaine, compilant les résultats de témoins, patients et sujets hyper radiosensibles. Cette démarche, permet de vérifier à la fois une corrélation quantitative du phénotype et l'évolution des phénomènes avec la dose.



Contents lists available at ScienceDirect

Comptes Rendus Biologies

www.sciencedirect.com



2 Sciences médicales / Medical sciences

3 Réponse individuelle aux radiations ionisantes : quel(s) test(s) 4 prédictif(s) choisir ?

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

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

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

11 ^bCentre de hadronthérapie Étoile, 69008 Lyon, France

12 ^cSociété Magelis, 84160 Cadenet, France

13 ^dCentre national d'études spatiales, 75001 Paris, France

14 ^eEA 3738, faculté de médecine, Lyon-Sud, 69921 Oullins, France

15 ^fService de radiothérapie, CHU A.-Michallon, Grenoble, France

16 ^gService de radiologie, CHU Lyon-Sud, 69490 Pierre-Bénite, France

INFO ARTICLE

Historique de l'article :

Reçu le 25 octobre 2010

Accepté après révision le 29 décembre 2010

Disponible sur internet le xxx

Mots clés :

Radiosensibilité

Radiations

Radiothérapie

Tests prédictifs

Expression

Mutations

Réparation de l'ADN

RÉSUMÉ

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

© 2011 Publié par Elsevier Masson SAS pour l'Académie des sciences.

ABSTRACT

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

Keywords:

Radiosensitivity

Radiations

Predictive assays

Gene expression

Mutations

Gene functions

DNA repair

* Auteur correspondant.

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

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

1631-0691/\$ – see front matter © 2011 Publié par Elsevier Masson SAS pour l'Académie des sciences.

doi:10.1016/j.crv.2010.12.018

Pour citer cet article : A. Granzotto, et al., Réponse individuelle aux radiations ionisantes : quel(s) test(s) prédictif(s) choisir ?, C. R. Biologies (2011), doi:10.1016/j.crv.2010.12.018

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

© 2011 Published by Elsevier Masson SAS on behalf of Académie des sciences.

17			
18	1. Les réactions suraiguës post-traitement : une		
19	définition encore subjective		
20	<i>1.1. Une limitation pour les traitements</i>		
21	On compte chaque année en France environ		
22	320 000 nouveaux cas de cancers. Une grande majorité		
23	d'entre eux sont traités par radiothérapie. Toutefois,		
24	certain patients, dont la proportion est généralement		
25	estimée entre 1 et 10 %, peuvent présenter des réactions		
26	tissulaires suraiguës dont la gravité et la date d'apparition		
27	dépendent de la nature du traitement, de la localisation		
28	tumorale et vraisemblablement du statut génétique. Les		
29	réactions tissulaires les plus fréquentes ne concernent pas		
30	systématiquement la peau avec les érythèmes et les		
31	dermites bien décrits et souvent subis par les pionniers		
32	des radiations. En effet, les praticiens peuvent faire face à		
33	des rectites pour les cancers de la prostate, des fibroses		
34	pour les cancers de l'œsophage, etc. Toutes ces réactions		
35	limitent le bon déroulement du traitement et peuvent		
36	même l'arrêter dans certains cas extrêmes [2,3].		
37	<i>1.2. Réactions précoces et tardives ou un continuum de</i>		
38	<i>réactions étalées dans le temps ?</i>		
39	Depuis des décennies, les réactions suraiguës post-		
40	irradiation ont été le plus souvent divisées en réactions		
41	<i>précoces</i> et réactions <i>tardives</i> [2,3]. En fait, les inflammations,		
42	infections, ulcères, fibroses, nécroses, arrêts fonctionnels,		
43	etc., sont rencontrés dans des périodes de temps très		
44	variables pendant ou après la fin du traitement. Des		
45	corrélations entre les réactions précoces et les réactions		
46	tardives ont été signalées pour certains tissus [4]. Dörr et		
47	Hendry ont introduit en 2001 la notion de réactions tardives		
48	dites « aggravées » (<i>consequential late effects</i> ou <i>CLE</i>) qui		
49	concernent essentiellement un organe, généralement asso-		
50	cié aux réactions radio-induites précoces, qui peut subir un		
51	stress mécanique ou chimique causant un traumatisme		
52	supplémentaire pour les tissus sous-jacents. C'est le cas		
53	notamment du système urinaire et intestinal et, dans une		
54	certaine mesure, de la peau [3]. On peut parler ici de réponse		
55	clinique des systèmes biologiques intégrés. Toutefois, avec		
56	le développement de thérapies innovantes basées sur un		
57	dépôt d'énergie de plus en plus massif dans la tumeur,		
58	l'incidence de certaines réactions considérées comme		
59	tardives avec les modalités courantes sont devenues de		
60	plus en plus précoces : un véritable continuum dans la		
	survenue et la gravité des réactions suraiguës post-	61	
	irradiation est apparu progressivement, remettant en cause	62	
	la distinction entre ces deux types de réactions [3].	63	
	<i>1.3. Une multitude d'échelles de gravité</i>	64	
	Au vu de la complexité des phénomènes, il paraît clair	65	
	qu'à ce jour, les actions concernant les réactions suraiguës	66	
	dues au traitement anti-cancéreux se font toujours sur la	67	
	seule base de l'expérience du clinicien et non sur des	68	
	critères quantifiables de biologie moléculaire, cellulaire ou	69	
	tissulaire, faute de paramètres fiables et identifiés. Le	70	
	terme-même de réactions « suraiguës », adopté arbitraire-	71	
	ment tout au long de cette revue fait encore débat. En dépit	72	
	d'un certain nombre de tentatives, la définition et la	73	
	classification des réactions suraiguës post-irradiation n'est	74	
	pas consensuelle. En effet, ces réactions suraiguës sont	75	
	justement définies sur des observations macroscopiques	76	
	difficilement quantifiables et des bases temporelles qui	77	
	sont peut-être aujourd'hui à moduler pour les raisons	78	
	évoquées plus haut. Citons toutefois les échelles WHO	79	
	(1979), CTC (1983), RTOG/EORTC (1984), LENT (1995), CTC	80	
	(1998), CTCAE (2003) qui sont représentatives des efforts	81	
	de la communauté pour une classification universelle [2].	82	
	L'insuffisance de prédiction et de définition biologique et	83	
	clinique des réactions suraiguës post-traitement explique	84	
	pourquoi leur nombre exact reste encore méconnu dans les	85	
	centres anti-cancer et les centres hospitaliers.	86	
	<i>1.4. Réactions tissulaires post-irradiation et erreurs de</i>	87	
	<i>dosimétrie</i>	88	
	À la suite des accidents de surirradiation d'Epinal et de	89	
	Toulouse, une échelle a été mise en place pour informer le	90	
	public sur les événements de radioprotection affectant des	91	
	patients dans le cadre d'une procédure de radiothérapie.	92	
	Résultat des efforts de l'Autorité de sûreté nucléaire (ASN),	93	
	de la Société française de radiothérapie Oncologique (SFRO)	94	
	et de l'Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire	95	
	(IRSN), cette échelle prend en compte des effets inattendus	96	
	ou imprévisibles dus à des doses ou à des volumes irradiés	97	
	inappropriés mais ne concerne pas les éventuels effets	98	
	secondaires, quel que soit leur grade, résultant de la	99	
	stratégie de traitement retenue par le praticien en	100	
	concertation avec le patient (voir les sites http://	101	
	www.asn.fr , http://www.sfro.org et http://www.irsn.fr).	102	
	Les réactions suraiguës post-irradiation ont été d'ailleurs	103	

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

- 106
- 107 • la formation : par obligation réglementaire, les praticiens
108 sont tenus de suivre des formations en radioprotection
109 qui n'incluent pas forcément les développements les plus
110 récents de radiobiologie. Les radiothérapeutes travaillent
111 chaque jour en collaboration étroite avec les radio-
112 physiciens alors que les radiobiologistes, peu nombreux,
113 ne sont généralement pas intégrés à l'hôpital ni ne
114 participent aux réunions régulières de travail et de
115 concertation. Ainsi, il est donc naturel que les cliniciens
116 se tournent préférentiellement vers leurs collègues
117 radiophysiciens quand un patient montre des réactions
118 suraiguës, d'autant plus que les mêmes manifestations
119 cliniques seraient attendues si la dose de radiation était
120 effectivement plus élevée ;
- 121 • les connaissances : le lien causal entre les réactions
122 suraiguës tissulaires et les altérations moléculaires n'est
123 pas encore clairement établi. Ce constat pose le problème
124 de la définition de la dose biologique, bien distincte de
125 celle de la dose physique, tant en termes spatiaux que
126 temporels. Comme on le verra plus loin, la complexité
127 des mécanismes moléculaires et cellulaires de la réponse
128 aux radiations explique qu'aucun test prédictif de la
129 radiosensibilité n'ait été encore accrédité et pourquoi de
130 très nombreuses directions ont été suivies par les
131 radiobiologistes, jetant alors le trouble dans la démarche
132 à suivre pour les praticiens.

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

150 2. La radiosensibilité intrinsèque : une évidence 151 centenaire

152 2.1. La susceptibilité individuelle aux radiations : l'évidence 153 d'un continuum

154 À ce stade de la revue, citons une communication écrite
155 par M. Bouchacourt en 1911. Ce Chef du service de
156 radiologie de l'hôpital Dubois décrit l'arrivée dans son
157 service d'un jeune couple de personnes de 27 et 23 ans qui
158 souhaitaient se faire épiler par irradiation [8]. Au départ
159 réticent à ce genre de traitement, Bouchacourt s'y plie
160 finalement et décrit en détails les différentes évolutions
161 des érythèmes et dermites sur les différentes parties du
162 corps du patient et de la patiente dans un article au titre
163 évocateur : « *Sur la différence de sensibilité aux rayons de
164 Röntgen des différents sujets, et sur le même sujet, des*

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

2.2. La radiosensibilité définie par convention

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

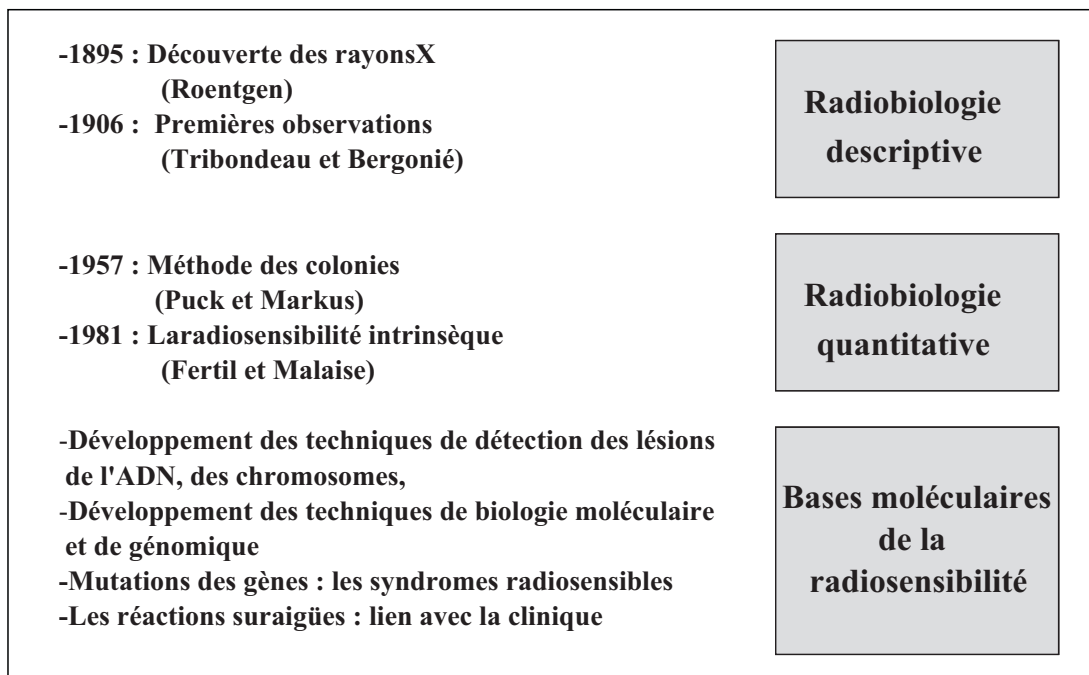


Fig. 1. Illustration schématique des différentes démarches de la radiobiologie depuis la découverte des rayons X par Röntgen : après une période descriptive des effets des radiations au niveau tissulaire puis cellulaire, où figurent en pionniers les travaux de Pierre Curie et de Victor Despeignes, suit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

224 *bras ...pendant 10h du chlorure de baryum radifère... ,*
 225 *...52 jours après... , il reste encore une plaie grisâtre*
 226 *indiquant une mortification profonde... » [13]. Ces deux*
 227 *exemples historiques montrent, avec celui de Bouchacourt,*
 228 *que la biologie des radiations resta descriptive dans ses*
 229 *premières années, faute de paramètres quantifiables*
 230 *(Fig. 1). Deux conclusions s'imposent :*

- 231
- 232 • avec Despeignes, la réduction du volume tumoral (ou
- 233 contrôle local) apparaît comme le meilleur paramètre
- 234 pour décrire l'effet stérilisant des radiations ;
- 235 • avec Curie, le processus de mort cellulaire et tissulaire
- 236 s'avère complexe et étalé dans le temps. De plus, la
- 237 plupart des cellules restent physiquement présentes,
- 238 suggérant que la mort cellulaire n'est pas nécessairement
- 239 associée à une disparition physique de la cellule. Les
- 240 connaissances biologiques n'étaient pas suffisantes à
- 241 l'époque pour définir un paramètre quantifiable précis.

242
 243 Ainsi, la mort radiobiologique fut définie comme la perte
 244 définitive de la capacité de division des cellules irradiées,
 245 puisque une telle définition restait commune à l'approche
 246 radiothérapeutique des cancers consistant à stériliser les
 247 tumeurs et aux observations expérimentales sur les morts
 248 tissulaires. Il fallut cependant attendre une soixantaine
 249 d'années afin qu'un test correspondant à une telle définition
 250 s'impose pour mesurer in vitro l'effet léthal causé par les
 251 radiations. En effet, Puck et Marcus proposèrent les premiers
 252 le test des colonies mesurant la survie clonogénique. Ce test
 253 devint le « standard » pour mesurer la radiosensibilité in
 254 vitro [14]. Ce test consiste à ensemercer un nombre connu

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

2.3. La radiosensibilité et ses pièges

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

286 des réponses aux radiations très différentes suivant leur
287 statut génétique ou que des tumeurs peuvent être très
288 radorésistantes en sont des contre-exemples.

289 2.4. La radiosensibilité quantifiée

290 Une fois la radiosensibilité définie, les radiobiologistes se
291 mobilisèrent pour mieux décrire, quantifier et comprendre
292 les bases moléculaires et cellulaires de la radiosensibilité
293 (Fig. 1). En 1981, une corrélation entre la réponse clinique
294 (contrôle local) et la radiosensibilité (évaluée in vitro par les
295 tests de survie clonogénique) fut établie par Fertil et Malaise,
296 non seulement pour les cellules tumorales, mais aussi pour
297 les tissus sains [1]. D'autre part, le continuum des réponses
298 clonogéniques observé entre les lignées les plus radio-
299 résistantes et les plus radiosensibles fut confirmé [1,16]. En
300 plus de cette corrélation, Fertil et Malaise confirmèrent à
301 partir d'une centaine de lignées cellulaires le bien-fondé de
302 la notion de radiosensibilité intrinsèque illustrée notam-
303 ment par le fait que les courbes de survie clonogénique se
304 croisent très rarement (Fig. 2). La valeur de la fraction
305 survivante à 2 Gy apparut rapidement comme le paramètre
306 de survie le plus pratique car le fractionnement de la dose en

307 sessions de 2 Gy était déjà et reste encore le traitement
308 radiothérapeutique le plus courant [17]. La surface sous la
309 courbe de survie (\bar{D}), représentant la dose correspondant à
310 37 % de survie fut également utilisée en tant que paramètre
311 de survie [17] (Fig. 2). En parallèle, de nombreuses études
312 biostatistiques furent consacrées à la description mathéma-
313 tique de la relation dose-effet. De nombreux modèles furent
314 proposés alliant un bon ajustement des courbes de survie
315 avec des théories biophysiques, biomoléculaires ou cellu-
316 laires. L'un des enjeux majeurs de ces efforts était de
317 comprendre si, à travers l'analyse de la pente initiale de la
318 courbe de survie, un seuil pouvait exister à des doses faibles.
319 Malgré la popularité du modèle (n, D_0) qui proposait une
320 pente initiale nulle, le modèle linéaire-quadratique (α, β)
321 s'imposa pour la fidélité de ces ajustements avec toutes les
322 courbes de survie. Malheureusement, ce modèle est
323 empirique et la signification biologique de ces paramètres
324 restent encore à démontrer [18] (Fig. 2).

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

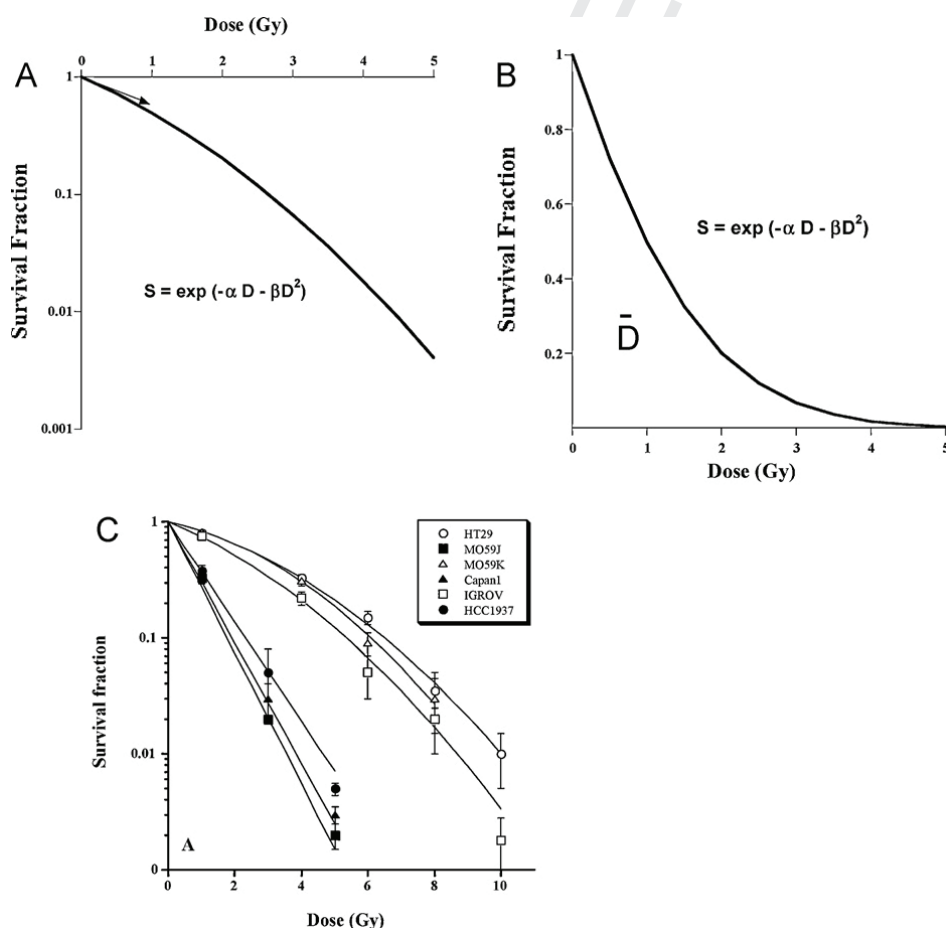


Fig. 2. Illustration schématique de la relation dose-effet décrite par les courbes de survie clonogénique issues des tests clonogéniques [14]. A. L'ajustement des courbes de survie est mieux assuré par le modèle linéaire-quadratique que par tout autre modèle biostatistique. B. La radiosensibilité qui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

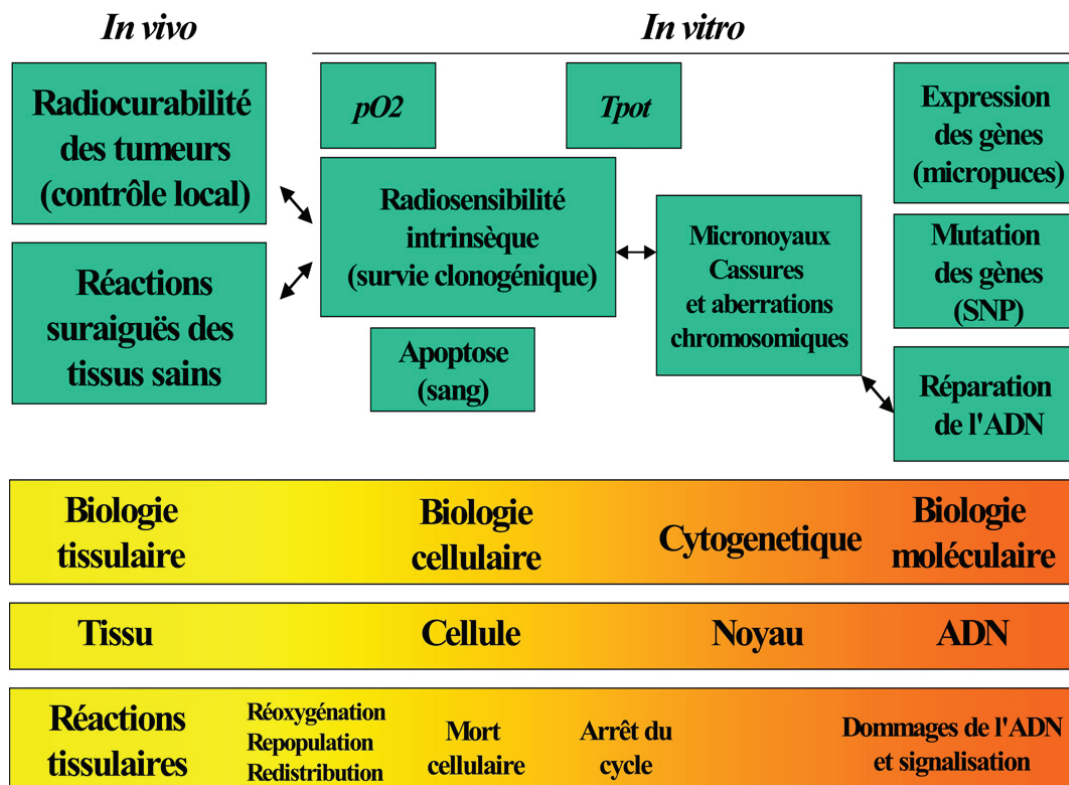


Fig. 3. Synopsis des différentes échelles et démarches qui ont donné les tests prédictifs de la radiosensibilité. Les développements ont suivi le progrès technologique et les connaissances fondamentales en rendant possibles des investigations aux niveaux moléculaires (ADN). Toutefois, le lien entre les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

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

- 341 • la prédiction de la radiosensibilité des tissus sains qui
 342 concentra des approches plus moléculaires dans l'iden-
 343 tification du rôle biologique des protéines de réparation
 344 de l'ADN ;
- 345 • la prédiction de la radiosensibilité des tumeurs qui
 346 mobilisa plutôt les efforts sur l'importance de la
 347 réoxygénation et de la prolifération cellulaire. C'est
 348 l'objet du chapitre suivant (Fig. 3).

350 **3. Les premiers essais prédictifs sur les tumeurs**

354 **3.1. Tests basés sur la mesure de la prolifération cellulaire :**
 355 *Tpot*

356 Comme le contrôle local de la tumeur était considéré
 357 comme le paramètre reflétant le mieux la radiocurabilité in
 358 vivo, il était logique d'analyser son équivalent in vitro,
 359 c'est-à-dire tous les indices de prolifération cellulaire qui

360 pouvaient expliquer l'augmentation du volume tumoral.
 361 Ce fut le cas du temps de doublement potentiel (*Tpot*). En
 362 règle générale, le *Tpot* fut mesuré à partir de biopsies
 363 tumorales à travers la définition suivante : $Tpot = Ts/LI$ où
 364 *Ts* est la durée de la phase de synthèse de l'ADN et *LI*
 365 désigne l'index de marquage (*label index* ou *LI*) c'est-à-dire
 366 la proportion de cellules synthétisant leur ADN. Une
 367 quantité considérable de données a été accumulée sur le
 368 *Tpot* pendant une vingtaine d'années et on estime à
 369 environ 2000 patients dans le monde le nombre de cas
 370 soumis à ce test [19–21]. Toutefois, le *Tpot* ne peut être
 371 considéré aujourd'hui comme un indicateur pronostique
 372 tant il existe de limites dans les applications de ce test. En
 373 particulier, le nombre de patients où la tumeur fut bien
 374 caractérisée était trop faible. De plus, comme ces tests
 375 nécessitaient une biopsie et un établissement de lignée in
 376 vitro, l'hétérogénéité intrinsèque de la tumeur pouvait
 377 conduire à fausser les données, voire à favoriser les sous-
 378 populations cellulaires les plus proliférantes. Enfin, la
 379 corrélation qui pouvait exister entre les rythmes de
 380 croissance observés in vitro en conditions (favorables)
 381 de culture et son rythme d'évolution in vivo était loin d'être
 382 vérifiée [19].

383 **3.2. Tests basés sur la mesure de l'hypoxie : *pO2***

384 Entre 1950 et 1970, l'impact de l'oxygène dans la
 385 réponse aux radiations, d'abord symbolisé par les travaux
 386 de Gray, a influencé un certain nombre de projets de
 387 recherche en radiobiologie. En particulier, l'hypothèse que

Pour citer cet article : A. Granzotto, et al., Réponse individuelle aux radiations ionisantes : quel(s) test(s) prédictif(s) choisir ?, C. R. Biologies (2011), doi:10.1016/j.crv.2010.12.018

388 la pression partielle d'oxygène (pO₂) inférieure à 10 mm de
389 mercure peut générer une situation favorisant la radio-
390 résistance a été à la base de la mesure systématique de la
391 pression en oxygène dans des biopsies de tumeurs [22].
392 Toutefois, la nécessité de faire appel à des technologies
393 avancées pour mesurer un tel paramètre a limité
394 considérablement les études. Même si certaines entre-
395 prises comme Eppendorf ont développé des techniques
396 basées sur la polarographie, les radiobiologistes et les
397 radiothérapeutes ont de nouveau été confrontés à l'hété-
398 rogénéité des tumeurs et à certains phénomènes anta-
399 gonistes d'intermittence hypoxie-réoxygénation qui
400 rendaient difficile l'obtention de données fiables. De plus,
401 l'utilisation de plus en plus fréquente du fractionnement
402 de la dose dans les modalités radiothérapeutiques favorise la
403 réoxygénation, limite les zones hypoxiques et donc
404 l'application d'un tel test [22]. Notons enfin que le taux
405 d'oxygénation dans les cultures cellulaires in vitro de
406 routine (5 % de CO₂) reste très éloigné de l'hypoxie relative
407 (10 à 20 % de CO₂) qui règne dans nos tissus.

408 4. Les différentes morts cellulaires

409 4.1. Quelles morts pour la mort radiobiologique ?

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

426 La mort mitotique est la voie de mort radio-induite la
427 plus importante pour tous les tissus à l'exception des
428 lymphocytes. Dans les années 1930, ce fait apparaissait
429 comme acquis [9]. La mort mitotique se caractérise par la
430 formation de micronoyaux, contenant des fragments
431 chromosomiques irréparables directement issus de cas-
432 sures de l'ADN qui se propagent tout au long du cycle
433 cellulaire jusqu'en mitose. La formation des micronoyaux
434 suit plusieurs étapes dont l'exonucléose qui décrit la sortie
435 du micronoyau du noyau cellulaire principal et l'exocytose
436 qui décrit la sortie du micronoyau de la cellule. Entre
437 l'exonucléose et l'exocytose peuvent s'écouler plusieurs
438 dizaines d'heures suivant l'état de prolifération des cellules
439 (Fig. 4). Le taux de micronoyaux radio-induits a été
440 quantitativement corrélé à la radiosensibilité depuis les
441 années 1960 grâce à un protocole simple et robuste
442 consistant à bloquer le processus d'exonucléose par des
443 drogues comme la cytochalasine B [23]. Cependant, les
444 tests de micronoyaux ont paru pour certains groupes de
445 recherche comme des protocoles expérimentaux aussi

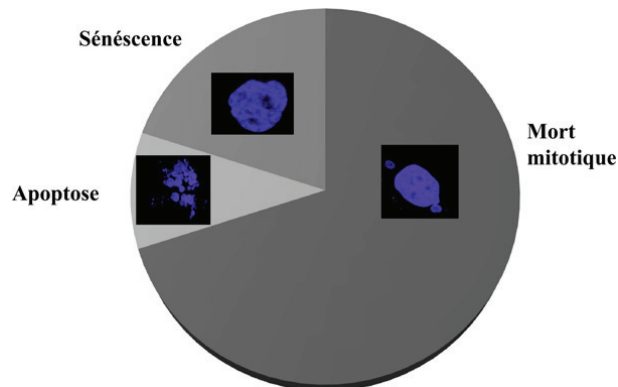


Fig. 4. Les trois principales morts radio-induites définies fonctionnellement. L'importance relative de la mort mitotique, de la sénescence et de l'apoptose représentée ici est celle que l'on rencontre habituellement pour les fibroblastes humains non-transformés. Les différentes proportions peuvent changer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

446 longs et lourds que la méthode des colonies : le test des
447 micronoyaux reste encore peu appliqué systématiquement
448 alors que la littérature suggère dans son ensemble qu'il
449 constituait le premier test cytogénétique prédictif de la
450 radiosensibilité [23].

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

476 L'apoptose est une voie de mort cellulaire très
477 spectaculaire et facilement détectable par microscopie
478 (Fig. 4). Ce terme est devenu si populaire que certains
479 auteurs considèrent l'apoptose comme un synonyme de
480 mort radio-induite et de radiosensibilité. Toutefois, il faut
481 rappeler qu'il n'existe toujours pas de corrélation quanti-
482 tative entre la radiosensibilité (survie clonogénique) et
483 l'apoptose, pour les tissus sains comme pour les tumeurs
484 [6,25,26]. En guise d'exemple représentatif, rappelons que

485 les fibroblastes de peau de patients atteints de l'ataxie
486 télangiectasique, le syndrome associé à la plus forte
487 radiosensibilité connue chez l'homme, ne montrent pas
488 d'apoptose [6]. En outre, les corps apoptotiques, issus du
489 hâchage de l'ADN par des nucléases sont encore trop
490 souvent confondus avec les micronoyaux de la mort
491 mitotique (Fig. 4). Cette erreur d'interprétation est
492 amplifiée par le développement de tests cytométriques
493 basés sur la détection de fragments d'ADN. En effet, comme
494 les micronoyaux sont des fragments d'ADN non réparés, de
495 nombreux faux-positifs peuvent signaler la présence de
496 corps apoptotiques alors que ce sont en fait de simples
497 micronoyaux [6].

498 À partir de 63 volontaires sains, Schmitz et al. ont
499 constaté que, pour un même donneur, les taux d'apoptose
500 radio-induite dans des lymphocytes T positifs pour les
501 marqueurs CD4 et CD8 ne sont corrélés ni entre eux, ni avec
502 ceux mesurés dans les lymphocytes B. En outre, le même
503 groupe de recherche a montré que l'apoptose spontanée et
504 radio-induite augmente significativement avec l'âge pour
505 les lymphocytes T positifs pour CD8 mais non pour ceux
506 positifs pour CD4 ni pour les lymphocytes B [27,28]. Enfin,
507 l'apoptose radio-induite est plus prononcée chez les
508 hommes pour les lymphocytes B et T positifs pour
509 CD8 et chez les femmes pour les lymphocytes T positifs
510 pour CD4 [27,28]. De tels résultats sont en désaccord avec
511 les travaux de Ozsahin et al. qui concluent à une corrélation
512 entre l'apoptose radio-induite des lymphocytes positifs
513 pour CD4 et CD8 d'un même donneur, indépendamment de
514 l'âge et du sexe [29,30]. Dans ce contexte particulier, un
515 certain nombre d'auteurs ont tenté d'établir un lien entre
516 l'apoptose et les réactions suraiguës post-traitement [31].
517 C'est notamment le cas des études sur l'apoptose radio-
518 induite après 8 Gy mesurée sur des lymphocytes T positifs
519 pour CD4 et CD8 issus de 399 patients irradiés. Aucune
520 association n'a été trouvée entre l'apoptose spontanée et
521 l'apoptose radio-induite. Les réactions tardives de grade
522 2 et de grade 3 ont été prédites par l'apoptose radio-induite
523 avec les lymphocytes T positifs pour CD8 mieux qu'avec les
524 lymphocytes T positifs pour CD4. Aucune prédiction des
525 réactions précoces n'a pu être effectuée [29,30]. Conscients
526 de la fiabilité des tests clonogéniques, des tests des
527 micronoyaux et des avantages des autres tissus tels que
528 les fibroblastes, Ozsahin et al. ont admis dans leur étude
529 que c'est plutôt la rapidité d'obtention des résultats qui
530 constitue le premier avantage de leur test d'apoptose
531 radio-induite [29]. Du point de vue statistique, la pré-
532 diction de ces tests ne concerne pas toute la gamme de
533 radiosensibilité mais une petite fenêtre de réactions
534 tardives [29,30]. D'autre part, la sévérité des réactions
535 de grade 2 ou 3 n'est pas corrélée quantitativement à
536 l'apoptose radio-induite : en d'autres termes, ce ne sont
537 pas les patients qui font les réactions les plus sévères qui
538 montrent les taux d'apoptose les plus élevés [29]. Ces
539 résultats suggèrent donc que l'apoptose pourrait prédire
540 une certaine gamme de radiosensibilité uniquement
541 associée à des réactions tardives et seulement limitée à
542 certains niveaux de gravité : l'apoptose radio-induite des
543 lymphocytes ne peut donc servir de test prédictif universel.
544 À l'évidence, de nouvelles investigations sont nécessaires
545 pour mieux évaluer la contribution de l'âge, du traitement

et de localisation tumorale pour affiner la zone de
confiance statistique de la mesure de l'apoptose radio-
induite dans la prédiction des réactions suraiguës post-
traitement.

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

5.1. Quel paramètre moléculaire prédictif faut-il choisir ?

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

- une gamme de réponses aux radiations aussi large que possible afin de définir des paramètres moléculaires ou cellulaires fiables permettant de prédire une situation quelconque pour une dose donnée ;
- des modèles humains ou humains-compatibles afin d'éviter les biais qui, en raison des différences entre espèces et de la gamme de dose étudiée, peuvent modifier les interprétations des phénomènes observés ;

606 • des conditions d'irradiation (dose, fractionnement, etc.)
608 et des modèles de tumeurs ou de tissus sains qui soient
609 cohérents avec la réalité clinique sans faire l'impasse sur
610 des relations dose-effet qui ne sont généralement pas
611 linéaires.

612
613 Pour la suite du paragraphe, gardons à l'esprit ces trois
614 conditions pour obtenir une corrélation quantifiée entre la
615 radiosensibilité cellulaire (survie clonogénique) et le
616 paramètre moléculaire à choisir.

617 5.2. Expression de gène et radiosensibilité

618 Si l'expression radio-induite d'un gène pouvait prédire
619 tous les niveaux de réponses cellulaires et tissulaires aux
620 radiations, cela impliquerait que l'expression de ce gène
621 varie avec la dose de radiation en corrélation avec la survie
622 clonogénique. Toutefois, les protéines impliquées dans les
623 événements radio-induits précoces (formation des dom-
624 mages de l'ADN, reconnaissance, signalisation et répara-
625 tion) sont très abondantes et aucune variation de leur
626 expression en fonction de la dose n'a encore été mise en
627 évidence. En revanche, certains acteurs protéiques impli-
628 qués dans les événements radio-induits plus tardifs
629 (plusieurs dizaines de minutes à plusieurs heures après
630 irradiation) montrent souvent (mais pas systématique-
631 ment) une sur- ou une sous-expression radio-induite. C'est
632 le cas notamment des protéines impliquées dans le
633 contrôle du cycle cellulaire et certaines voies de mort
634 cellulaire comme la protéine p21 (désormais appelée
635 CDKN1A) [7]. Une étude récente utilisant la technique de la
636 Q-PCR quantitative (*quantitative polymerase chain reaction*)
637 et concernant des cultures de lymphocytes T établis à
638 partir de 22 patientes atteintes d'un cancer du sein a
639 montré que le niveau d'expression de CDKN1A prédit
640 correctement la survie clonogénique après 2 Gy [32]. À
641 l'inverse, en utilisant la technologie des micropuces,
642 Svensson et al. ont constaté que sur les lymphocytes de
643 38 patients souffrant de carcinome de la prostate (dont
644 21 avec des complications graves et 17 sans symptôme
645 apparent), aucune sur- ou sous-expression radio-induite
646 sur les milliers de gènes testés ne pouvait prédire les
647 réactions suraiguës post-irradiation [33]. Comme on le
648 voit, la variété des techniques utilisées ne facilitent pas
649 l'interprétation sur le pouvoir potentiellement prédictif de
650 l'expression des gènes. Il faut donc considérer pour
651 l'instant ces tests comme des outils ponctuels, utiles pour
652 la détermination d'une réponse éventuellement anormale
653 aux radiations dans des conditions très spécifiques mais
654 sans donner forcément une mesure quantitative de
655 l'ampleur de la réaction. Notons enfin que, comme la
656 plupart de ces tests d'expression de gènes sont effectués
657 sur des lymphocytes, des investigations sont nécessaires
658 pour vérifier la validité de ces tests sur d'autres tissus plus
659 directement concernés par les réactions suraiguës post-
660 irradiation.

661 Notons également quelques pièges concernant l'expres-
662 sion des gènes. Par exemple, certaines mutations de la
663 célèbre protéine p53, causent souvent une surexpression du
664 gène qui évolue avec la dose et qui est généralement associée
665 à une forte radiorésistance [34]. D'autre part, les nouvelles

technologies basées sur les ARN interférents (*short inter-
ference RNA* ou siRNA) permettent aujourd'hui de diminuer
l'expression de gènes afin de mieux comprendre leur rôle
biologique. Cependant, rappelons que la diminution dras-
tique voire l'extinction *in vitro* totale de certains gènes
n'existe pas à l'état naturel. Ainsi, une expression de gène
réduite par génie génétique mais qui n'est jamais éteinte en
réalité peut conduire le chercheur à conclure sur des effets
qui n'ont pas de sens physiologique. C'est notamment le cas
pour de nombreux gènes dont les mutations homozygotes ne
sont pas viables chez l'homme. Un exemple particulier est le
gène *BRCA1*, dont les mutations hétérozygotes sont impli-
quées dans les cancers familiaux du sein alors que les
mutations homozygotes conduisent à la létalité cellulaire : le
gène est toujours exprimé chez l'homme alors que les siRNA
de *BRCA1* sont largement utilisés dans la littérature pour
simuler les conséquences biologiques de ses mutations [34-
36]. On pourra d'ailleurs citer dans le même cas la
neurofibromatose [37].

5.3. Mutation de gène et radiosensibilité

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

La génomique et la protéomique ont facilité et
popularisé la recherche de certains polymorphismes de
gènes impliqués dans la réponse aux radiations : c'est le cas
des polymorphismes concernant un simple nucléotide
(*single nucleotide polymorphism*, ou SNP) [31]. Les poly-
morphismes désignent des variations de paires de bases du
génome qui n'entraînent pas des changements conforma-
tionnels mesurables. En particulier, les SNP représentent

666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684

685

686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724

725 90 % des cas de polymorphismes et se retrouvent dans
726 notre génome toutes les 300 paires de bases : un individu
727 est donc porteur de plusieurs centaines de milliers de SNP
728 où généralement une cytosine se substitue à une thymine.
729 Les progrès de la génomique ont permis l'identification
730 d'un nombre considérable de SNP. Toutefois, le lien entre
731 polymorphismes et syndromes n'est cependant pas
732 évident puisque la substitution d'une base par une autre
733 ne suffit généralement pas (par définition) à modifier
734 significativement le tableau clinique. Certains SNP des
735 gènes *ATM*, *XRCC1*, *XRCC3*, *SOD2*, *RAD21*, *TGF-β1* et *PARP-1*
736 ont été mis en évidence et ont été associés à une réponse
737 anormale aux radiations [7,31,44–46]. Cependant, là
738 encore, parce que les porteurs d'un même SNP peuvent
739 montrer des réactions suraiguës de grades différents, un
740 seul SNP ne peut expliquer tous les gradients de réponses
741 aux radiations et donc ne peut être corrélé à la radio-
742 sensibilité. Notons enfin que, face à la non-significativité
743 des corrélations entre un seul SNP et les manifestations
744 d'une radiosensibilité, certains auteurs regroupent plu-
745 sieurs SNP ensemble d'une part et plusieurs gradients de
746 sévérité de réactions d'autre part : la nature de la
747 corrélation (souvent significative) s'en trouve évidemment
748 biaisée [47]. La détermination de SNP pourrait cependant
749 être utile pour la prédiction de prédispositions à certains
750 cancers et à des réponses bien particulières sur des
751 localisations tumorales spécifiques [44–46]. C'est juste-
752 ment le cas des SNP de la *PARP-1* qui pourraient être
753 associés à certains cancers de la prostate, de l'œsophage et
754 du poumon [7,31].

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

763 5.4. Le sang en question

764 À ce stade de la revue, nous devons insister sur le fait
765 que la majorité des expériences sur l'expression ou la
766 mutation des gènes ont été effectuées sur des lymphocytes
767 (sang frais ou cellules transformées). Pourtant, les réac-
768 tions suraiguës post-irradiation concernent plus particu-
769 lièrement les tissus conjonctifs, l'épithélium ou
770 l'endothélium. Ainsi, même si le choix des lymphocytes
771 reste principalement basé sur des considérations pratiques
772 de rapidité, de disponibilité et d'acquisition simplifiée
773 (pour le praticien, un prélèvement sanguin est facile à
774 mettre en place), il suggère néanmoins plusieurs remar-
775 ques importantes :

- 777 • l'existence de corrélation entre les effets in vitro mesurés
778 sur le sang et la prédiction de réactions cliniques survenant
779 sur d'autres tissus bien différents reste encore à vérifier ;
- 780 • l'apoptose, plus fréquente dans les cellules sanguines
781 que dans les autres tissus pourrait constituer un biais
782 technique dans la mise au point des tests prédictifs de la
783 radiosensibilité ;

- 784 • la taille des noyaux de lymphocytes est environ 1,5 fois
785 plus petite que celles des noyaux cellulaires des autres
786 tissus, suggérant l'organisation d'une chromatine plus
787 condensée qui pourrait également constituer un biais
788 technique dans la prédiction de la radiosensibilité ;
- 789 • la manipulation des lymphocytes est délicate (faible
790 espérance de vie en culture in vitro) et peut nécessiter
791 alors une transformation par le virus d'Epstein-Barr
792 (EBV) qui modifie la radiosensibilité (les lymphocytes
793 transformés ou lymphoblastes sont généralement plus
794 radiorésistants que leurs homologues non-transformés)
795 [48,49].

800 En 1990, Kushiro et al. n'ont pas trouvé de corrélation
801 entre la radiosensibilité de fibroblastes et de lymphocytes
802 issus d'un même donneur [50]. En 1991, à partir de
803 fibroblastes et de lymphocytes irradiés en phase G0/G1,
804 Green et al. ont montré sur 34 donneurs que les
805 fibroblastes discriminaient les patients en fonction de leur
806 radiosensibilité alors que les lymphocytes ne le permet-
807 taient pas [51]. Enfin, en 1992, à partir de 30 fibroblastes et
808 29 lymphocytes, Geara et al. conclurent également qu'il n'y
809 avait pas de corrélation entre la survie clonogénique des
810 fibroblastes et celle des lymphocytes provenant d'un
811 même donneur [52]. Ainsi, malgré l'incontestable rapidité
812 de tests prédictifs basés sur les lymphocytes, une analyse
813 générale de la littérature incite à la plus grande prudence
814 quant à la portée des résultats obtenus avec ce type de
815 cellules. De nouvelles approches systématiques viendront
816 sans doute à bout de ces limitations.

817 6. La fonction de réparation

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

832 6.1. Cytogénétique : entre cassures et aberrations 833 chromosomiques

834 La cytogénétique est née d'observations microscopi-
835 ques anciennes et de la mise au point de techniques de
836 colorations des chromosomes, notamment avec le colorant
837 Giemsa [53] (Fig. 5). Ainsi, les cassures mais aussi les
838 aberrations chromosomiques devinrent détectables donc
839 mesurables. Concernant les cassures chromosomiques,
840 leur induction apparut rapidement proportionnelle à la
841 dose ainsi que celle des micronoyaux dont elles sont la
842 cause [54]. Toutefois, un facteur limitant l'intérêt de ces
843 tests cytogénétiques est la période de temps (quelques
844

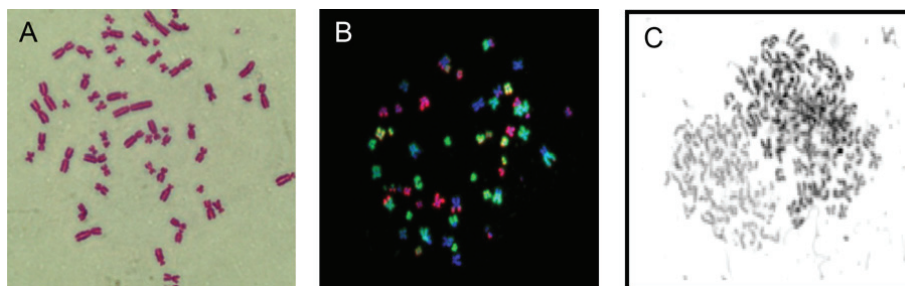


Fig. 5. Illustration de l'évolution technologique de la cytogénétique. A. Chromosomes colorés par Giemsa où les différentes zones condensées apparaissent plus foncées. B. Chromosomes colorés par la technique du FISH où les télomères sont marqués en jaune. C. Fusion par condensation prématurée des chromosomes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

845 heures) nécessaire pour obtenir des métaphases, indis- 890
846 pensables à la visualisation de chromosomes. En effet, au 891
847 cours de cette période de temps, certains phénomènes de 892
848 réparation peuvent se produire et biaiser le résultat final. 893
849 C'est d'ailleurs encore plus le cas pour la dosimétrie 894
850 biologique des irradiations accidentelles où cette période 895
851 s'ajoute aux incertitudes sur les paramètres de l'exposition 896
852 exacte aux radiations pendant l'accident. Afin d'éviter ce 897
853 biais, la technique de condensation prématurée des 898
854 chromosomes (PCC ou *premature chromosome condensa-* 899
855 *tion*) a été mise au point. La PCC consiste à faire apparaître 900
856 plus rapidement les fragments chromosomiques en 901
857 fusionnant la cellule testée avec une cellule en mitose. 902
858 L'hétérodiakaryon ainsi formé permet l'échange des fac- 903
859 teurs mitotiques à la cellule en G0/G1 et produit alors une 904
860 condensation prématurée de la chromatine. La PCC a 905
861 permis d'établir une corrélation entre cassures chromo- 906
862 somiques non réparées et radiosensibilité [11,55]. C'est 907
863 grâce à cette technique que Cornforth et Bedford (1987) 908
864 démontrèrent avec une lignée fibroblastique humaine 909
865 qu'une cassure chromosomique non réparée par cellule 910
866 suffit à entraîner un événement létal [56] (Fig. 5).

867 Concernant les aberrations chromosomiques, elles sont 911
868 soit stables (translocations), soit instables (chromosomes 912
869 dicentriques, acentriques, anneaux) [57,58]. L'incidence 913
870 des dicentriques et des fragments acentriques est géné- 914
871 ralement proportionnelle à la dose. Par contre, l'incidence 915
872 des translocations suit souvent une loi linéaire-quadrati- 916
873 que. Cette dernière observation a pu être considérée 917
874 comme un argument de corrélation avec les courbes de 918
875 survie clonogénique qui obéissent au modèle linéaire- 919
876 quadratique (α , β). Toutefois, les paramètres d'ajustement 920
877 ne sont pas comparables quantitativement et des lignées 921
878 radiosensibles qui montrent pourtant des aberrations 922
879 chromosomiques comme les lignées mutées pour le gène 923
880 *ATM* ont des courbes de survie mono-exponentielles [42].

881 En 1986, une avancée technologique s'est produite avec 924
882 le développement de sondes spécifiques de chromosomes 925
883 entiers ou de structures chromosomiques (centromères, 926
884 télomères) [59]. Cette technique couramment appelée 927
885 FISH (*fluorescence in situ hybridization*) a permis de 928
886 dénombrer avec précision la plupart des types d'aberra- 929
887 tions [60]. La méthode du FISH associée ou non à la PCC a 930
888 permis d'établir une corrélation entre les cassures chro- 931
889 mosomiques et la radiosensibilité. Toutefois, la lourdeur de 932

ces techniques l'a emporté sur sa fiabilité à refléter la 890
réponse aux radiations [60,61] (Fig. 5).

Enfin, plus récemment, une autre technique, l'hybrida- 892
tion génomique comparative (*comparative genomic hybri-* 893
dization ou CGH) a été développée sur la base des progrès 894
de la génomique de masse et permet aujourd'hui de 895
dresser rapidement la carte cytogénétique de n'importe 896
quelle tumeur [62,63]. Cependant, la CGH fournit la liste 897
des séquences répétées qui peuvent éventuellement 898
refléter l'instabilité génomique et l'association à certains 899
cancers mais ne peut révéler des aberrations stables 900
comme des translocations ou des inversions. D'autre part, 901
la CGH ne peut être une mesure d'effet radio-induit de 902
haute précision puisque les dommages de l'ADN sont 903
généralement distribués au hasard sur tout le génome et de 904
façon stochastique dans chaque cellule. Ainsi, les CGH ne 905
peuvent refléter une relation dose-effet indispensable à la 906
prédiction de l'effet létal radio-induit ni donc se substituer 907
à des tests fonctionnels. 908

Les techniques cytogénétiques comme le FISH ou la 909
coloration Giemsa fournissent actuellement l'une des 910
bases prédictives de la radiosensibilité les plus fiables. 911
D'ailleurs, encore aujourd'hui, la dosimétrie biologique 912
reste basée sur des mesures cytogénétiques de dicentri- 913
ques, de translocations voire de marqueurs télomériques 914
[64]. À ce titre, signalons que les tests cytogénétiques 915
développés par l'IRSN sont les seuls tests de dosimétrie 916
biologique accrédités en France [65]. Toutefois, ces tests 917
ont pour but d'estimer la dose biologique de radiations 918
qu'un individu a pu subir lors d'un accident et non de 919
caractériser la susceptibilité individuelle car les mêmes 920
taux de cassures et/ou d'aberrations chromosomiques 921
peuvent être produits par des dysfonctionnements molé- 922
culaires et des causes génétiques très différents [66,67]. 923

6.2. Réparation par suture et réparation par recombinaison 924 homologue : quoi d'autre ? 925

Comme les dommages chromosomiques sont générés 926
par des lésions de l'ADN, il semblait donc logique d'étudier, 927
après la cytogénétique, les mécanismes de réparation de 928
l'ADN et leur lien éventuel avec la radiosensibilité (Fig. 1 et 929
2) [10,42,68-70]. Cependant, quel dommage radio-induit 930
de l'ADN choisir pour mieux prédire la radiosensibilité ? 931
Dans une revue précédente, nous avons exposé tous les 932

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

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

960 En plus de ces interrogations, les modèles actuels de
961 réparation des CDB issus des données sur les rongeurs et
962 les microorganismes, impliquent une vingtaine d'acteurs
963 majeurs dont les mutations ne correspondent à aucun
964 syndrome connu chez l'homme. En effet, les protéines Ku,
965 DNA-PKcs, RAD51, RAD52 sont indispensables à la vie
966 cellulaire (mitose, méiose, etc.) et leur absence n'est pas
967 viable chez l'homme [6]. À l'inverse, les levures ou les
968 cellules de rongeurs porteurs de mutations de Ku, DNA-
969 PKcs, RAD51, RAD52 existent mais sont radiosensibles
970 [40,72,73]. Ce paradoxe s'explique notamment par le fait
971 que les gènes humains se distinguent souvent de leurs
972 homologues des autres espèces par des différences
973 importantes de séquences avec rarement les mêmes
974 fonctions biologiques [74,75]. Par exemple, la protéine
975 Rad51 humaine porte un domaine endonucléase III qui
976 permet à cette protéine de couper l'ADN alors que le gène
977 considéré comme homologue chez la bactérie, appelé
978 RecA, possède une séquence deux fois moins longue et un
979 domaine endonucléase est absent [74,75]. L'accumulation
980 des connaissances sur les séquences des gènes s'est en effet
981 effectuée à une vitesse bien plus grande que la détermi-
982 nation de leurs fonctions biologiques. Ainsi, l'usage des
983 mêmes sigles des gènes est effectivement trompeur. En
984 prenant l'exemple du gène *BRCA1*, associé aux cancers
985 familiaux du sein et de l'ovaire, rappelons que la séquence
986 du gène *Brca1* chez le rat n'a que 58 % d'identité de
987 séquence avec son homologue humain *BRCA1* [76]. De plus,
988 il faut souligner que les modèles de rongeurs mutés pour
989 *Brca1* montrent très rarement des phénotypes associés à
990 des cancers du sein mais quand ils en montrent, les
991 mutations considérées sont issues du génie génétique avec
992 des expressions de gène conditionnelles [77]. Ainsi, l'usage
993 des noms-mêmes des gènes doit inspirer une grande

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

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

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

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

994
995
996
997
998
999
1000
1001
1002
1003
1004
1005
1006
1007
1008
1009
1010
1011
1012
1013
1014
1015
1016
1017
1018
1019
1020
1021
1022
1023
1024
1025
1026
1027
1028
1029
1030
1031
1032
1033
1034
1035
1036
1037
1038
1039
1040
1041
1042
1043
1044
1045
1046
1047
1048
1049
1050
1051
1052

1053 XP, sont souvent associés à la même survie clonogénique
1054 après 2 Gy (SF2) [6,11].

1055 6.4. Le test H2AX n'est pas suffisant pour expliquer toute la
1056 radiosensibilité humaine

1057 Comme évoqué dans les chapitres ci-dessus, une grande
1058 majorité de radiobiologistes ont développé des
1059 études monogéniques qui ont l'avantage d'élucider le rôle
1060 biologique d'un seul gène dans la réponse aux radiations.
1061 Cependant, une telle approche ne peut fournir une vue
1062 globale et comparative du continuum des réactions post-
1063 irradiation. Récemment, la technique d'immunofluores-
1064 cence basée sur des marqueurs d'histones H2AX phos-
1065 phorylés (γ -H2AX) a permis une mesure précise du
1066 nombre de CDB au sein-même du noyau des cellules

irradiées sous la forme de foci nucléaires. Il existe une
relation linéaire entre le nombre de CDB et le nombre de
foci γ -H2AX [82]. Malheureusement, malgré la précision et
la rapidité (quelques heures de traitement) de ce test, la
réalité est plus complexe. D'une part, le signal de
fluorescence et la lisibilité des foci γ -H2AX peuvent être
perturbés par des dysfonctionnements de la chromatine
dus au traitement ou au statut génétique (Fig. 6). D'autre
part, comme il est précisé dans le paragraphe suivant, les
foci γ -H2AX disparaissent à un rythme normal dans
certains cas de radiosensibilités [6,11].

Depuis une dizaine d'années, au rebours des études
monogéniques, notre groupe a délibérément choisi d'adop-
ter une démarche avec le plus grand spectre possible de
radiosensibilité. La relation entre la radiosensibilité et la
réparation des CDB a été examinée dans un premier temps au

1067
1068
1069
1070
1071
1072
1073
1074
1075
1076
1077
1078
1079
1080
1081
1082

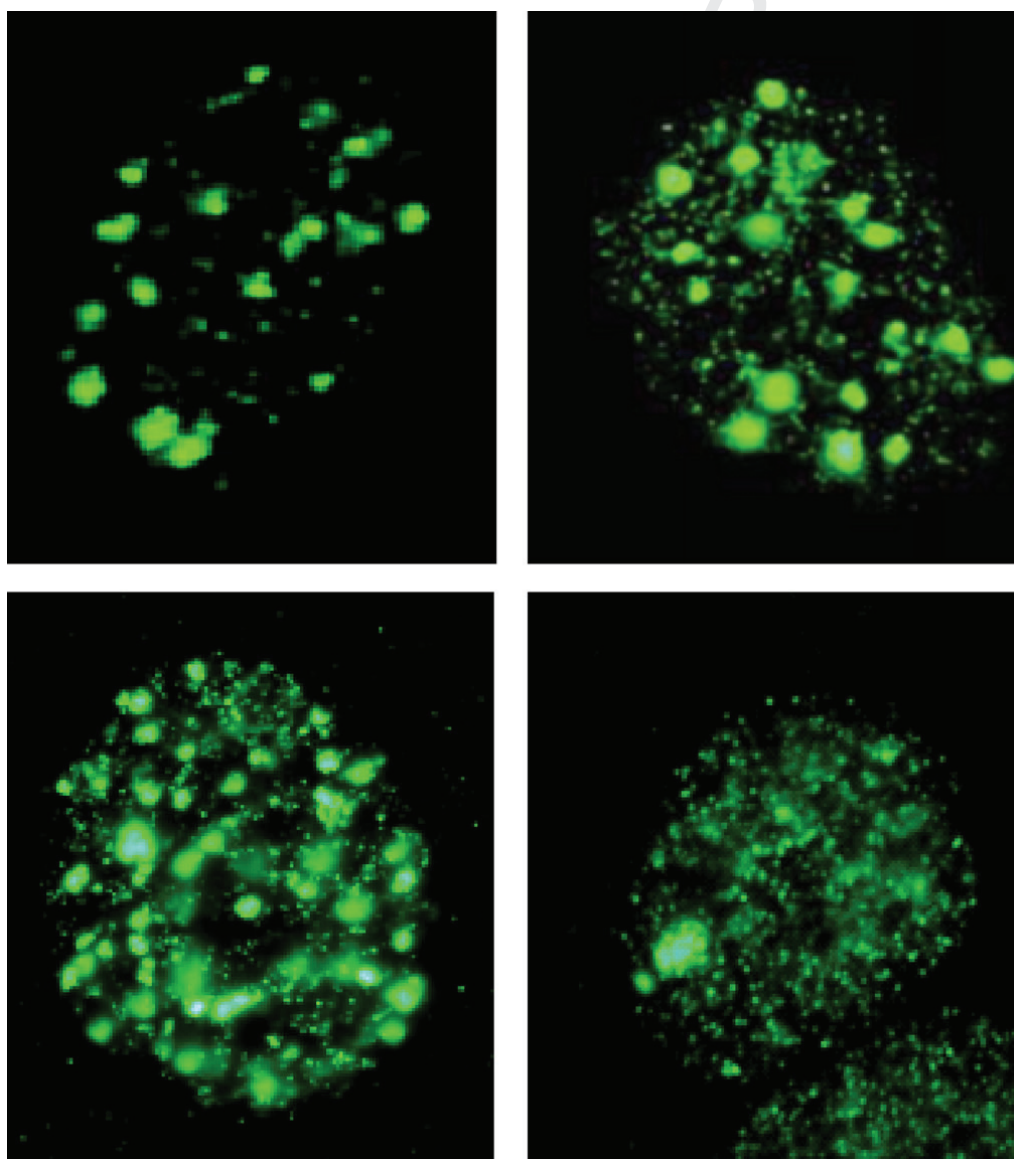


Fig. 6. Exemples représentatifs d'images de noyaux de cellules humaines irradiées contenant des foci γ -H2AX obtenus par immunofluorescence. Pour le même traitement (2 Gy de rayons X suivies de 4 h de réparation), on peut dénombrer les foci γ -H2AX dans les deux photos du haut. Toutefois, le fond du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

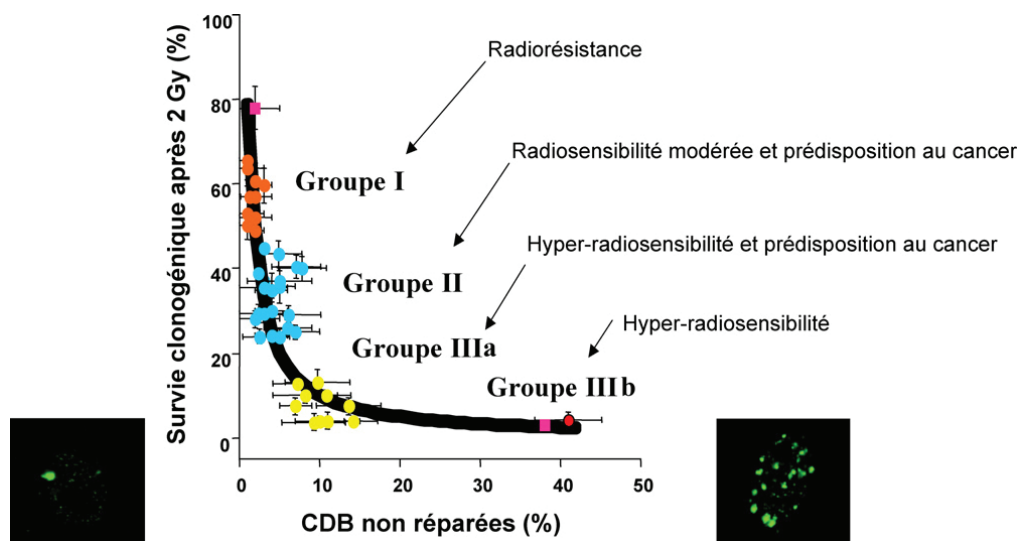


Fig. 7. Relation entre la SF2 et le pourcentage de CDB non réparées mesurée par immunofluorescence γ -H2AX 24 h après l'irradiation. Ces données sont issues de [11]. Les flèches désignent les différents groupes de radiosensibilité (groupe I : 65,6 % < SF2 < 45,2 % ; groupe II : 45,2 % < SF2 < 7,4 % ; groupe III : SF2 < 7,4 %). Le groupe III contient pour l'instant deux sous-groupes concernant respectivement certaines mutations de ATM (IIIa) et certaines mutations de la ligase IV et de DNA-PKcs (IIIb). Les carrés roses correspondent aux lignées de rongeur très radiorésistantes et très radiosensibles de la famille CHO-xrs [11]. La SF2 est inversement proportionnelle aux CDB non réparées. Les deux photos montrent des exemples représentatifs de foci γ -H2AX après 24 h sur des lignées radiosensibles et radiorésistantes.

1083 sein d'une collection de 40 fibroblastes humains représen- 1107
 1084 tant au moins huit différents syndromes génétiques [6,11]. 1108
 1085 Cette démarche se poursuit aujourd'hui avec une centaine de 1109
 1086 lignées cellulaires issus de syndromes connus ou de patients 1110
 1087 ayant montré de fortes réactions tissulaires après radio- 1111
 1088 thérapie. L'application systématique de la plupart des tests 1112
 1089 moléculaires prédictifs de la radiosensibilité nous a permis 1113
 1090 d'obtenir une corrélation quantitative entre la radiosensibi- 1114
 1091 lité cellulaire et la réparation des CDB valable pour toutes les 1115
 1092 cellules de mammifères : la SF2 apparaît comme inverse- 1116
 1093 ment proportionnelle au taux de CDB non réparées 1117
 1094 reconnues par la phosphorylation de H2AX (Fig. 7). Une 1118
 1095 telle corrélation nous apprend qu'il suffit d'un à deux CDB 1119
 1096 restant encore non réparées 24 h après irradiation pour 1120
 1097 entraîner la mort d'une cellule irradiée [6,11]. Cependant, le 1121
 1098 test γ -H2AX ne permet à lui seul de prédire l'ensemble de la 1122
 1099 radiosensibilité humaine. En effet, ce test distingue difficile- 1123
 1100 ment les cellules radiorésistantes des cellules montrant une 1124
 1101 radiosensibilité modérée. Sur la Fig. 7, on voit notamment 1125
 1102 que la limite inférieure de ce que l'on pourrait appeler des 1126
 1103 cellules radiorésistantes cohabitent avec la limite supérieure 1127
 1104 du groupe de cellules montrant une radiosensibilité modérée 1128
 1105 mais significative. Pour des raisons statistiques, on ne peut 1129
 1106 ainsi affirmer que ces fibroblastes sont déficients dans la voie 1130
 1107 NHEJ. Étant irradiés en quiescence (G0/G1), la voie HR ne 1131
 1108 peut être incriminée. De tels cas de radiosensibilité modérée 1132
 1109 suggèrent donc l'existence d'une troisième voie de réparation 1133
 1110 des CDB, indépendante des deux autres et dont le dysfonctionnement 1134
 1111 serait responsable d'une radiosensibilité modérée. 1135

1113 6.5. La voie MRE11-dépendante, une alternative à la 1136
 1114 réparation par suture 1137

1115 Dans notre étude, toutes les cellules de radiosensibilité 1138
 1116 modérée proviennent soit de syndromes génétiques 1139

1117 associés à une forte prédisposition au cancer, soit de 1118
 1119 patients traités pour un cancer. De façon systématique, ces 1120
 1121 cellules montrent également un taux de foci nucléaires 1122
 1122 formés par la protéine MRE11 significativement plus élevé 1123
 1123 après irradiation que les cellules plus radiorésistantes 1124
 1124 (Fig. 8). La protéine MRE11 est une nucléase dont la 1125
 1125 séquence est particulièrement conservée à travers les 1126
 1126 espèces. Le fait qu'une protéine qui peut couper soit 1127
 1127 anormalement plus active dans des cellules associées à une 1128
 1128 forte instabilité génomique impliquée suggère qu'elle joue 1129
 1129 un rôle dans un processus de réparation recombinatoire 1130
 1130 fautif [11]. Le nombre de foci MRE11 a été justement corrélé 1131
 1131 à des phénomènes d'hyper-recombinaison indépendant de 1132
 1132 la HR et associé à une forte prédisposition au cancer [11]. Le 1133
 1133 test des foci MRE11 permettrait donc la quantification de la 1134
 1134 « mauvaise » réparation, responsable de l'instabilité 1135
 1135 génomique mais participant aussi à la réparation globale 1136
 1136 et donc aux processus de radiorésistance. Le double test γ - 1137
 1137 H2AX-MRE11 nous donne alors une vision quantifiée de la 1138
 1138 radiosensibilité et de l'instabilité génomique radio-induite. 1139
 1139 Une classification des cellules en fonction de leur SF2 et des 1140
 1140 taux de foci γ -H2AX et MRE11 a donc été proposée : 1141

- le groupe I décrit les cellules radiorésistantes sans 1142
 instabilité génomique particulière ; 1143
- le groupe II rassemble les cellules montrant une radio- 1144
 sensibilité modérée (SF2 comprise entre 7 et 45 %), un 1145
 taux de CDB non réparées inférieur à 7 % et une forte 1146
 instabilité génomique. Il regroupe notamment la plupart 1147
 des syndromes génétiques associés à une forte prédis- 1148
 position au cancer et les patients montrant des réactions 1149
 suraiguës après un traitement radiochimiothérapique ; 1150
- le groupe III concerne les cellules hyper-radiosensibles 1151
 (SF2 inférieures à 7 %) et correspond à des syndromes 1152
 génétiques dont les premiers signes cliniques sont 1153
 observés au niveau pédiatrique [6,11] (Fig. 7). 1154

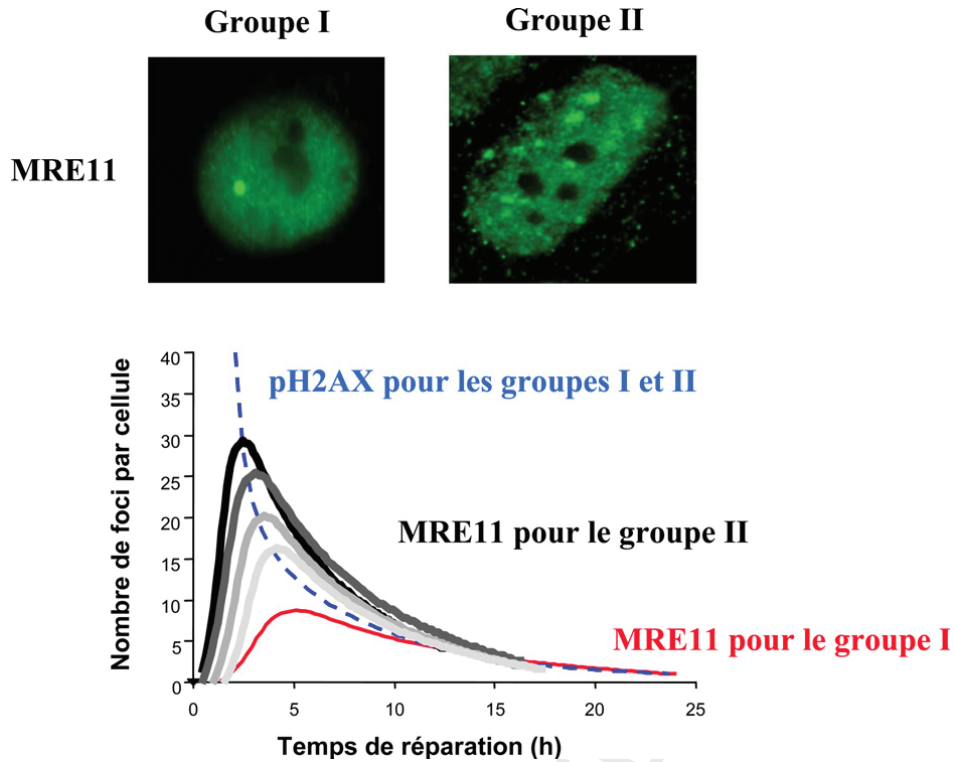


Fig. 8. Foci MRE11 et patients radiosensibles. Les cellules des patients du groupe II (radiosensibilité modérée et prédisposition au cancer) montrent un nombre de foci MRE11 radio-induits plus nombreux que les patients du groupe I (radiorésistants). Ces conclusions sont illustrées à la fois par des photos d'immunofluorescence (haut) et le graphe (bas) résumant schématiquement le nombre de foci MRE11 au cours du temps après une dose de 2 Gy de rayons X [11].

1156 6.6. Un lien fort avec les conditions cliniques d'irradiation

1158 Dans le cadre d'une radiothérapie où la dose est
1159 fractionnée, les cellules du groupe II accumulent des taux
1160 de CDB non réparées non négligeables au fur et à mesure
1161 des sessions de radiothérapie. Les réactions suraiguës
1162 peuvent alors survenir quand ces taux atteignent des

valeurs comparables à celles obtenues en dose unique pour
des cellules du groupe III [6,11] (Fig. 9). La définition de ces
trois groupes est bien sûr provisoire. Notre laboratoire la
documente régulièrement par l'ajout de nouvelles données
sur des syndromes génétiques connus associés à une
radiosensibilité et/ou une forte prédisposition au cancer
mais surtout à partir de biopsies de peau issues de patients

1163
1164
1165
1166
1167
1168
1169

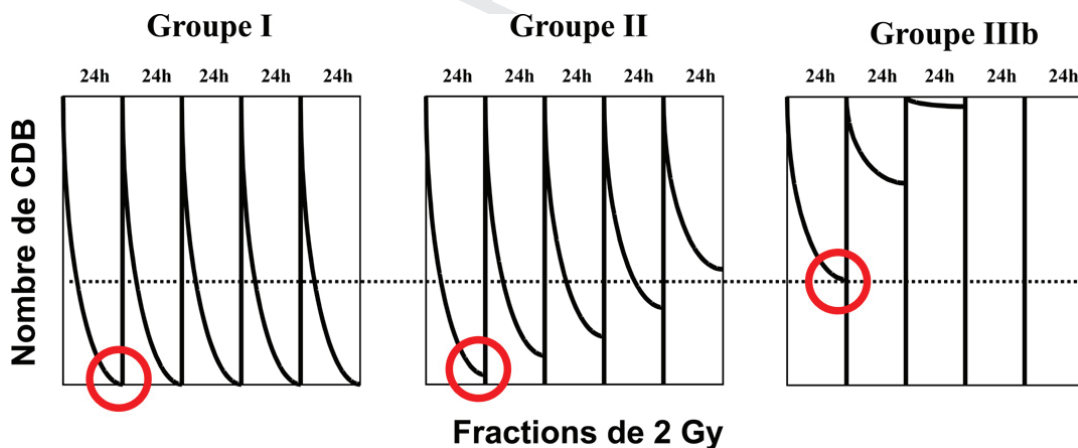


Fig. 9. Influence du groupe de radiosensibilité dans la réponse au fractionnement de dose : lors d'une séance de dose fractionnée standard (2 Gy espacés de 24 h), le nombre de CDB diminue avec le temps de réparation jusqu'à un taux de CDB non réparables. Ce taux s'accumule progressivement tout au long des séances pour atteindre éventuellement des taux de toxicité (pointillés) comparables aux effets observés en dose unique pour les cellules les plus radiosensibles (groupe III). Ainsi, les patients du groupe II, souffrant d'un défaut de réparation faible en dose unique, peuvent montrer des réactions suraiguës résultant d'une accumulation de dommages à partir d'un nombre de séances de radiothérapie théoriquement prévisible par les tests de réparation.

1170 ayant montré des réactions suraiguës à la suite de leur
1171 traitement radiothérapeutique. À partir d'un double test γ -
1172 H2AX-MRE11 sur une biopsie de peau, il est donc
1173 aujourd'hui possible de prédire de façon fiable la radio-
1174 sensibilité des tissus sains d'un individu tant en termes
1175 diagnostiques que pronostiques, et ce, quelle que soit la
1176 modalité d'irradiation.

1177 En plus des doses utilisées habituellement en radio-
1178 thérapie, il faut également souligner l'importance crois-
1179 sante de la prise en compte des faibles doses de rayons X
1180 appliquées soit par l'imagerie portale pendant le traite-
1181 ment radiothérapeutique, soit par des radiodiagnostic
1182 standard (scanners, radiographies, etc.). La mise en
1183 évidence du phénomène d'hypersensibilité aux faibles
1184 doses de rayons X généralement observé entre 1 mGy et
1185 50 cGy sur des tissus à fort pouvoir métastatique constitue
1186 également une véritable opportunité pour éprouver nos
1187 hypothèses sur le pouvoir prédictif des tests basés sur la
1188 réparation des CDB [83]. Ainsi, aucune expression de gène
1189 ni aucune mutation unique n'a jusqu'à présent été corrélée
1190 au phénomène d'hyperradiosensibilité aux faibles doses
1191 afin de prédire la radiosensibilité observée dans un
1192 continuum allant de 1 mGy à plusieurs Gy [83,84]. Par
1193 contre, certaines fonctions comme l'activité kinase de
1194 DNA-PK ou la mesure des taux non réparés des CDB
1195 permettent aujourd'hui de mieux rendre compte de ce
1196 phénomène [83-85].

1197 6.7. La radiosensibilité et les réactions observées en clinique

1198 Nous avons cité dans cette revue des maladies
1199 génétiques associées à de fortes radiosensibilités causées
1200 par des mutations homozygotes mais dont la fréquence
1201 est de l'ordre de 1/100 000 : elles ne constituent donc
1202 pas la majorité des cas de radiosensibilité que l'on peut
1203 rencontrer dans les services de radiothérapie à la suite
1204 d'un traitement anti-cancer. À l'inverse, les cas observés
1205 en radiothérapie sont plutôt des cas de radiosensibilités
1206 modérées (groupe II) (Granzotto et al., en préparation).
1207 Une radiosensibilité modérée de type groupe II est
1208 justement l'un des symptômes cliniques associé aux
1209 mutations hétérozygotes de la plupart des gènes
1210 précités. Les porteurs hétérozygotes des gènes comme
1211 *ATM*, *NBS1*, *MRE11* pourraient ainsi représenter une
1212 fraction importante des patients radiosensibles. En
1213 particulier, les porteurs de mutations hétérozygotes
1214 d'*ATM* représentent environ 1 % de la population
1215 mondiale et seraient associés à des prédispositions au
1216 cancer plus élevées que la moyenne [86]. Quantifier et
1217 tenir compte de la susceptibilité individuelle reste donc
1218 une des tâches majeures de la radiobiologie et de la
1219 radiothérapie. Rappelons toutefois que le seul patient
1220 portant une mutation de la ligase IV a été soumis puis a
1221 succombé à son traitement radiothérapeutique à la suite
1222 d'un lymphome détecté dans son adolescence alors que
1223 rien ne laissait supposer durant les premières années de
1224 sa vie qu'il souffrait d'une telle radiosensibilité [87]. Plus
1225 récemment encore, en 2010, un patient atteint d'une
1226 tumeur de Wilms a succombé à son traitement
1227 radiothérapeutique : une analyse *post-mortem* a conclu à
1228 une mutation du gène *ATM* [88]. Les doses appliquées en

radiothérapie sont évidemment plus élevées qu'un stress 1229
environnemental quotidien et pourraient mettre en 1230
évidence brutalement des affections peu décelables 1231
dans la vie de tous les jours. 1232

7. Conclusions 1233

Les bases moléculaires et cellulaires de la radio- 1234
sensibilité sont incroyablement complexes. Toutefois, leur 1235
élucidation rendra possible le développement de tests 1236
fiables : 1237

- pour prédire l'efficacité des traitements radiochi- 1238
miothérapeutiques contre les tumeurs ; 1239
- pour anticiper et optimiser les nouvelles modalités anti- 1240
cancer (*cyberknife*, irradiation par modulation d'inten- 1241
sité, micro-irradiations, hadronthérapie, etc.) ; 1242
- pour prévoir et prévenir l'apparition des réactions 1243
suraiguës. 1244

Sept points majeurs sont à retenir : 1245

- les tissus sains comme les tumeurs montrent un très 1246
large spectre de radiosensibilité dont le statut génétique 1247
est l'un des facteurs essentiels ; 1248
- la rapidité d'un protocole n'est pas une preuve de fiabilité 1249
ni de prédictibilité : les différences inter-individuelles, 1250
inter-organes, inter-tissus ainsi que les tests molécu- 1251
laires rapides peuvent être des pièges. De plus, l'usage 1252
des lymphocytes peut entraîner des biais dans la 1253
prédiction des réactions radio-induites des tissus 1254
conjonctifs ; 1255
- la mesure de la survie clonogénique reste le « *standard* » 1256
cellulaire pour évaluer quantitativement la radiosensi- 1257
bilité *in vitro*, prédire la radiocurabilité des tumeurs *in* 1258
vivo et prévoir les réactions suraiguës sur les tissus sains 1259
irradiés ; 1260
- tous les paramètres relatifs à la croissance cellulaire ou à 1261
l'hypoxie sont insuffisants pour prédire correctement la 1262
radiosensibilité des tissus sains ou des tumeurs ; 1263
- les tests cytogénétiques rendent assez fidèlement 1264
compte d'une large gamme de radiosensibilité mais la 1265
période de temps nécessaire à l'obtention des méta- 1266
phases peut être source de biais ; 1267
- la mesure de l'expression radio-induite ou la détermina- 1268
tion de SNP souvent effectuées à partir de lymphocytes 1269
présentent des avantages de rapidité, d'acquisition de 1270
données, mais la littérature actuelle suggère qu'ils ne 1271
prédisent pas suffisamment la relation dose-effet ainsi 1272
que les réactions suraiguës qui surviennent générale- 1273
ment sur les autres tissus ; 1274
- l'étude d'une multitude de syndromes génétiques 1275
consolide la conclusion que les tests prédictifs basés 1276
sur la fonctionnalité des voies de réparation de l'ADN 1277
permettent de quantifier et de prévenir les réactions 1278
suraiguës post-traitement quelle que soit leur sévérité. 1279
De nouvelles investigations sont cependant néces- 1280
saires pour établir encore plus finement les relations 1281
existant entre les dysfonctionnements de la réparation 1282
des CDB et la radiosensibilité et choisir au mieux le ou 1283
les marqueurs prédictifs des acteurs de la réparation. 1284
1285
1286
1287
1288
1289
1290
1291
1292

1299 **Conflit d'intérêt**1300 **Aucun.**1301 **Remerciements**

1302 Nous remercions les Prs M. Tubiana (Académie des
1303 sciences), J.L. Lagrange (CHU Henri-Mondor de Créteil),
1304 E. Lartigau (centre Oscar-Lambret, Lille), J.-M. Cosset
1305 (institut Curie, Paris), J. Bourhis (institut Gustave-Roussy,
1306 Villejuif), les Drs C. Carrie et L. Claude (centre Léon-Bérard,
1307 Lyon) ainsi que l'équipe des praticiens hospitaliers de
1308 l'hôpital cantonal de Genève pour leur concours. Nous
1309 remercions également les Drs E.P. Malaise, V. Favaudon,
1310 D. Averbek, P. Gourmelon et L. Sabatier pour leurs conseils
1311 précieux. Ce travail a été réalisé grâce au soutien
1312 d'Électricité de France (Commission de radioprotection),
1313 du Centre national d'études spatiales, de l'Agence natio-
1314 nale de la recherche, de l'Institut national du cancer et de
1315 l'Association pour la recherche sur l'ataxie-telangiectasie.
1316 Les auteurs de cette revue ont reçu le Prix Louis-Fontaine
1317 2008 de la Fondation Rhône-Alpes Futur pour leur travail
1318 sur la prédiction des réactions suraiguës après traitement
1319 radiochimiothérapique. G.V. est lauréat du Prix Mallet
1320 2009 et N.F. est lauréat de l'Académie des sciences (Prix
1321 Peyré 2009).

1322 **Références**

- 1323 [1] B. Fertil, E.P. Malaise, Inherent cellular radiosensitivity as a basic
1324 concept for human tumor radiotherapy, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*
1325 *7* (1981) 621-629.
1326 [2] RTOG/EORTC, Late effects consensus conference, *Radiother. Oncol.* *35*
1327 (1995) 5-7.
1328 [3] W. Dörr, J.H. Hendry, Consequential late effects in normal tissues,
1329 *Radiother. Oncol.* *61* (2001) 223-231.
1330 [4] R. Abderrahmani, A. Francois, V. Buard, M. Benderitter, J.C. Sabourin,
1331 D.L. Crandall, et al., Effects of pharmacological inhibition and
1332 genetic deficiency of plasminogen activator inhibitor-1 in radia-
1333 tion-induced intestinal injury, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *74*
1334 (2009) 942-948.
1335 [5] D. Ash, Lessons from epinal, *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.)* *19* (2007) 614-
1336 615.
1337 [6] A. Joubert, N. Foray, Intrinsic radiosensitivity and DNA double-strand
1338 breaks in human cells, *Cancer Radiother.* *11* (2007) 129-142.
1339 [7] C. Hennequin, L. Quero, V. Favaudon, Determinants and predictive
1340 factors of tumour radiosensitivity, *Cancer Radiother.* *12* (2008) 3-13.
1341 [8] M.L. Bouchacourt, Sur la différence de sensibilité aux rayons de Röntgen
1342 de la peau des différents sujets et sur le même sujet des différents
1343 régions du corps, in: *S.p.I.A.d. Sciences (Ed.), Masson, Paris, 1911,*
1344 pp. 942-947.
1345 [9] C. Regaud, A. Lacassagne, Effets histophysiologiques des rayons de
1346 Röntgen et de Becquerel-Curie sur les tissus adultes normaux des
1347 animaux supérieurs, in: C. Regaud (Ed.), *Radiophysologie et radio-*
1348 *thérapie, Presses Universitaires de France, Paris, France, 1927.*
1349 [10] D. Averbek, Mechanisms of repair and radiation-induced mutagenesis
1350 in higher eukaryotes, *Cancer Radiother.* *4* (2000) 335-354.
1351 [11] A. Joubert, K. Gamo, Z. Bencokova, J. Gastaldo, W. Rénier, N. Chavaudra,
1352 et al., DNA double-strand break repair defects in syndromes associated
1353 with acute radiation response: at least two different assays to predict
1354 intrinsic radiosensitivity? *Int. J. Radiat. Biol.* *84* (2008) 1-19.
1355 [12] V. Despeignes, *Lyon Medical* 26 juillet 1896 (1896) 428-506.
1356 [13] P. Curie, H. Becquerel, Action physiologique des rayons du radium, *C. R.*
1357 *Acad. Sci.* *82* (1901) 1289.
1358 [14] T.T. Puck, P.I. Marcus, Action of X-rays on mammalian cells, *J. Exp. Med.*
1359 *103* (1956) 653-666.
1360 [15] J. Bergonié, L. Tribondeau, Interprétation de quelques résultats de la
1361 radiothérapie et essai de fixation d'une technique rationnelle, *C. R.*
1362 *Acad. Sci.* *143* (1906) 983-984.
1363 [16] P.J. Deschavanne, B. Fertil, A review of human cell radiosensitivity in
1364 vitro, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *34* (1996) 251-266.

- [17] B. Fertil, H. Dertinger, A. Courdi, E.P. Malaise, Mean inactivation dose: a
1365 useful concept for intercomparison of human cell survival curves,
1366 *Radiat. Res.* *99* (1984) 73-84. 1367
[18] B. Fertil, I. Reydellet, P.J. Deschavanne, A benchmark of cell survival
1368 models using survival curves for human cells after completion of repair
1369 of potentially lethal damage, *Radiat. Res.* *138* (1994) 61-69. 1370
[19] A.C. Begg, The clinical status of Tpot as a predictor? Or why no tempest
1371 in the Tpot!, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *32* (1995) 1539-1541. 1372
[20] K. Haustermans, J. Fowler, K. Geboes, M.R. Christiaens, A. Lerut, E. van
1373 der Schueren, Relationship between potential doubling time (Tpot),
1374 labeling index and duration of DNA synthesis in 60 esophageal and
1375 35 breast tumors: is it worthwhile to measure Tpot? *Radiother. Oncol.*
1376 *46* (1998) 157-167. 1377
[21] P. Antognoni, N.H.A. Terry, A. Richetti, R. Luraghi, M. Tordiglione, M.
1378 Danova, The predictive role of flow cytometry-derived tumor potential
1379 doubling time (Tpot) in radiotherapy: open questions and future
1380 perspectives, *Int. J. Oncol.* *12* (1998) 245-256. 1381
[22] F. Eschwege, J. Bourhis, T. Girinski, E. Lartigau, M. Guichard, D. Deble,
1382 et al., Predictive assays of radiation response in patients with head and
1383 neck squamous cell carcinoma: a review of the Institute Gustave
1384 Roussy experience, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *39* (1997) 849-853. 1385
[23] M. Fenech, The in vitro micronucleus technique, *Mutat. Res.* *455* (2000)
1386 81-95. 1387
[24] H. Zhang, Molecular signaling and genetic pathways of senescence: its
1388 role in tumorigenesis and aging, *J. Cell Physiol.* *210* (2007) 567-574. 1389
[25] B. Zhivotovskiy, B. Joseph, S. Orrenius, Tumor radiosensitivity and
1390 apoptosis, *Exp. Cell Res.* *248* (1999) 10-17. 1391
[26] P.L. Olive, R.E. Durand, Apoptosis: an indicator of radiosensitivity in
1392 vitro? *Int. J. Radiat. Biol.* *71* (1997) 695-707. 1393
[27] A. Schmitz, J. Bayer, N. Dechamps, L. Goldin, G. Thomas, Heritability of
1394 susceptibility to ionizing radiation-induced apoptosis of human lym-
1395 phocyte subpopulations, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *68* (2007)
1396 1169-1177. 1397
[28] A. Schmitz, J. Bayer, N. Dechamps, G. Thomas, Intrinsic susceptibility to
1398 radiation-induced apoptosis of human lymphocyte subpopulations,
1399 *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *57* (2003) 769-778. 1400
[29] M. Ozsahin, N.E. Crompton, S. Gourgou, A. Kramar, L. Li, Y. Shi, et al.,
1401 CD4 and CD8 T-lymphocyte apoptosis can predict radiation-induced
1402 late toxicity: a prospective study in 399 patients, *Clin. Cancer Res.* *11*
1403 (2005) 7426-7433. 1404
[30] M. Ozsahin, H. Ozsahin, Y. Shi, B. Larsson, F.E. Wurgler, N.E. Crompton,
1405 Rapid assay of intrinsic radiosensitivity based on apoptosis in human
1406 CD4 and CD8 T-lymphocytes, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *38* (1997)
1407 429-440. 1408
[31] M. Fernet, J. Hall, Predictive markers for normal tissue reactions:
1409 fantasy or reality? *Cancer Radiother.* *12* (2008) 614-618. 1410
[32] C. Badie, S. Dziwura, C. Raffy, T. Tsigani, G. Alsbeih, J. Moody, et al.,
1411 Aberrant CDKN1A transcriptional response associates with abnormal
1412 sensitivity to radiation treatment, *Br. J. Cancer* *98* (2008) 1845-
1413 1851. 1414
[33] J.P. Svensson, L.J. Stalpers, R.E. Esveldt-van Lange, N.A. Franken, J.
1415 Haveman, B. Klein, et al., Analysis of gene expression using gene sets
1416 discriminates cancer patients with and without late radiation toxicity,
1417 *PLoS Med.* *3* (2006) e422. 1418
[34] N. Foray, V. Randrianarison, D. Marot, M. Perricaudet, G. Lenoir, J.
1419 Feunteun, Gamma-rays-induced death of human cells carrying muta-
1420 tions of BRCA1 or BRCA2, *Oncogene* *18* (1999) 7334-7342. 1421
[35] M. Promkan, G. Liu, P. Patmasiriwat, S. Chakrabarty, BRCA1 modulates
1422 malignant cell behavior, the expression of survivin and chemosen-
1423 sitivity in human breast cancer cells, *Int. J. Cancer* *125* (2009) 2820-
1424 2828. 1425
[36] E. Cabuy, C. Newton, P. Slijepcevic, BRCA1 knock-down causes telomere
1426 dysfunction in mammary epithelial cells, *Cytogenet. Genome Res.* *122*
1427 (2008) 336-342. 1428
[37] K.H. Yohay, The genetic and molecular pathogenesis of NF1 and NF2,
1429 *Semin. Pediatr. Neurol.* *13* (2006) 21-26. 1430
[38] E. Weterings, D.C. van Gent, The mechanism of non-homologous
1431 end-joining: a synopsis of synapsis, *DNA Repair (Amst)* *3* (2004)
1432 1425-1435. 1433
[39] A. Dudas, M. Chovanec, DNA double-strand break repair by homolo-
1434 gous recombination, *Mutat. Res.* *566* (2004) 131-167. 1435
[40] N. Foray, P. Verrelle, Réparations et réparatoses : entre modèles molé-
1436 culaires et réalité clinique, *Bull. Cancer* 2010 (in press). 1437
[41] C.M. McConville, T. Stankovic, P.J. Byrd, G.M. McGuire, Q.Y. Yao, G.G.
1438 Lennox, et al., Mutations associated with variant phenotypes in ataxia-
1439 telangiectasia, *Am. J. Hum. Genet.* *59* (1996) 320-330. 1440
[42] N. Foray, A. Priestley, G. Alsbeih, C. Badie, E.P. Capulas, C.F. Arlett, et al.,
1441 Hypersensitivity of ataxia telangiectasia fibroblasts to ionizing radia-
1442 tion is associated with a repair deficiency of DNA double-strand breaks,
1443 *Int. J. Radiat. Biol.* *72* (1997) 271-283. 1444

Q2

- 1445 [43] C.F. Arlett, P.N. Plowman, P.B. Rogers, C.N. Parris, F. Abbaszadeh, M.H. Green, et al., Clinical and cellular ionizing radiation sensitivity in a patient with xeroderma pigmentosum, *Br. J. Radiol.* 79 (2006) 510–517.
- 1446 [44] D. Azria, M. Ozsahin, A. Kramar, S. Peters, D.P. Encio, N.E. Crompton, et al., Single nucleotide polymorphisms, apoptosis, and the development of severe late adverse effects after radiotherapy, *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 6284–6288.
- 1447 [45] K. De Ruyck, M. Van Eijkeren, K. Claes, K. Bacher, A. Vral, W. De Neve, et al., TGFbeta1 polymorphisms and late clinical radiosensitivity in patients treated for gynecologic tumors, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 65 (2006) 1240–1248.
- 1448 [46] J. Werbrout, K. De Ruyck, F. Duprez, L. Veldeman, K. Claes, M. Van Eijkeren, et al., Acute normal tissue reactions in head-and-neck cancer patients treated with IMRT: influence of dose and association with genetic polymorphisms in DNA DSB repair genes, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 73 (2009) 1187–1195.
- 1449 [47] O. Zschenker, A. Raabe, I.K. Boeckelmann, S. Borstelmann, S. Szymczak, S. Wellek, et al., Association of single nucleotide polymorphisms in ATM, GSTP1, SOD2, TGFBI, XPD and XRCC1 with clinical and cellular radiosensitivity, *Radiother. Oncol.* 97 (2010) 26–32.
- 1450 [48] C.F. Arlett, M.H. Green, A. Priestley, S.A. Harcourt, L.V. Mayne, Comparative human cellular radiosensitivity: I. The effect of SV40 transformation and immortalisation on the gamma-irradiation survival of skin derived fibroblasts from normal individuals and from ataxia-telangiectasia patients and heterozygotes, *Int. J. Radiat. Biol.* 54 (1988) 911–928.
- 1451 [49] J. Cole, C.F. Arlett, M.H. Green, S.A. Harcourt, A. Priestley, L. Henderson, et al., Comparative human cellular radiosensitivity: II. The survival following gamma-irradiation of unstimulated (G0) T-lymphocytes, T-lymphocyte lines, lymphoblastoid cell lines and fibroblasts from normal donors, from ataxia-telangiectasia patients and from ataxia-telangiectasia heterozygotes, *Int. J. Radiat. Biol.* 54 (1988) 929–943.
- 1452 [50] J. Kushiuro, N. Nakamura, S. Kyoizumi, M. Nishiki, K. Dohi, M. Akiyama, Absence of correlations between radiosensitivities of human T-lymphocytes in G0 and skin fibroblasts in log phase, *Radiat. Res.* 122 (1990) 326–332.
- 1453 [51] M.H. Green, C.F. Arlett, J. Cole, S.A. Harcourt, A. Priestley, A.P. Waugh, et al., Comparative human cellular radiosensitivity: III. Gamma-radiation survival of cultured skin fibroblasts and resting T-lymphocytes from the peripheral blood of the same individual, *Int. J. Radiat. Biol.* 59 (1991) 749–765.
- 1454 [52] F.B. Geara, L.J. Peters, K.K. Ang, J.L. Wike, S.S. Sivon, R. Guttenberger, et al., Intrinsic radiosensitivity of normal human fibroblasts and lymphocytes after high- and low-dose-rate irradiation, *Cancer Res.* 52 (1992) 6348–6352.
- 1455 [53] H.J. Evans, Actions of radiations on human chromosomes, *Phys. Med. Biol.* 17 (1972) 1–13.
- 1456 [54] S.J. Grote, G.P. Joshi, S.H. Revell, C.A. Shaw, Observations of radiation-induced chromosome fragment loss in live mammalian cells in culture, and its effect on colony-forming ability, *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* 39 (1981) 395–408.
- 1457 [55] C. Badie, G. Iliakis, N. Foray, G. Alsheih, B. Cedervall, N. Chavaudra, et al., Induction and rejoining of DNA double-strand breaks and interphase chromosome breaks after exposure to X rays in one normal and two hypersensitive human fibroblast cell lines, *Radiat. Res.* 144 (1995) 26–35.
- 1458 [56] M.N. Cornforth, J.S. Bedford, A quantitative comparison of potentially lethal damage repair and the rejoining of interphase chromosome breaks in low passage normal human fibroblasts, *Radiat. Res.* 111 (1987) 385–405.
- 1459 [57] J.M. Brown, M.S. Kovacs, Visualization of nonreciprocal chromosome exchanges in irradiated human fibroblasts by fluorescence in situ hybridization, *Radiat. Res.* 136 (1993) 71–78.
- 1460 [58] J.N. Lucas, R.K. Sachs, Using three-color chromosome painting to test chromosome aberration models, *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* 90 (1993) 1484–1487.
- 1461 [59] D. Pinkel, T. Straume, J.W. Gray, Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization, *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* 83 (1986) 2934–2938.
- 1462 [60] F. Darroudi, J. Fomina, M. Meijers, A.T. Natajara, Kinetics of the formation of chromosome aberrations in X-irradiated human lymphocytes, using PCC and FISH, *Mutat. Res.* 404 (1998) 55–65.
- 1463 [61] A. Leonard, J. Rueff, G.B. Gerber, E.D. Leonard, Usefulness and limits of biological dosimetry based on cytogenetic methods, *Radiat. Prot. Dosimetry* 115 (2005) 448–454.
- 1464 [62] A.S. Ishkanian, G. Zafarana, J. Thoms, R.G. Bristow, Array CGH as a potential predictor of radiotherapy in intermediate risk prostate cancer, *Acta Oncol.* 49 (2010) 888–894.
- 1465 [63] S. Tapio, S. Hornhardt, M. Gomolka, D. Leszczynski, A. Posch, S. Thalhammer, et al., Use of proteomics in radiobiological research: current state of the art, *Radiat. Environ. Biophys.* 49 (2010) 1–4.
- 1466 [64] J.P. Murnane, L. Sabatier, Chromosome rearrangements resulting from telomere dysfunction and their role in cancer, *Bioessays* 26 (2004) 1164–1174.
- 1467 [65] A. Vaurijoux, G. Gruel, F. Pouzoulet, E. Gregoire, C. Martin, S. Roch-Lefevre, et al., Strategy for population triage based on dicentric analysis, *Radiat. Res.* 171 (2009) 541–548.
- 1468 [66] L. Roy, E. Gregoire, V. Durand, V. Buard, M. Delbos, N. Paillolle, et al., Study of the tools available in biological dosimetry to estimate the dose in cases of accidental complex overexposure to ionizing radiation: the Lilo accident, *Int. J. Radiat. Biol.* 82 (2006) 39–48.
- 1469 [67] S. Derreumaux, C. Etard, C. Huet, F. Trompier, I. Clairand, J.F. Bottollier-Depois, et al., Lessons from recent accidents in radiation therapy in France, *Radiat. Prot. Dosimetry* 131 (2008) 130–135.
- 1470 [68] N. Foray, C. Monroco, B. Marples, J.H. Hendry, B. Fertil, D.T. Goodhead, et al., Repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in human fibroblasts is consistent with a continuous spectrum of repair probability, *Int. J. Radiat. Biol.* 74 (1998) 551–560.
- 1471 [69] N. Foray, C.F. Arlett, E.P. Malaise, Underestimation of the small residual damage when measuring DNA double-strand breaks (DSB): is the repair of radiation-induced DSB complete? *Int. J. Radiat. Biol.* 75 (1999) 1589–1595.
- 1472 [70] N. Chavaudra, J. Bourhis, N. Foray, Quantified relationship between cellular radiosensitivity, DNA repair defects and chromatin relaxation: a study of 19 human tumour cell lines from different origin, *Radiother. Oncol.* 73 (2004) 373–382.
- 1473 [71] N. Foray, C.F. Arlett, E.P. Malaise, Radiation-induced DNA double-strand breaks and the radiosensitivity of human cells: a closer look, *Biochimie* 79 (1997) 567–575.
- 1474 [72] P.A. Jeggo, Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells, *Radiat. Res.* 150 (1998) S80–91.
- 1475 [73] P.A. Jeggo, L.M. Kemp, X-ray-sensitive mutants of Chinese hamster ovary cell line. Isolation and cross-sensitivity to other DNA-damaging agents, *Mutat. Res.* 112 (1983) 313–327.
- 1476 [74] S. Vispe, M. Defais, Mammalian Rad51 protein: a RecA homologue with pleiotropic functions, *Biochimie* 79 (1997) 587–592.
- 1477 [75] A. Shinohara, T. Ogawa, Rad51/RecA protein families and the associated proteins in eukaryotes, *Mutat. Res.* 435 (1999) 13–21.
- 1478 [76] L.M. Bennett, H.A. Brownlee, S. Hagavik, R.W. Wiseman, Sequence analysis of the rat Brca1 homolog and its promoter region, *Mamm. Genome* 10 (1999) 19–25.
- 1479 [77] B. Evers, J. Jonkers, Mouse models of BRCA1 and BRCA2 deficiency: past lessons, current understanding and future prospects, *Oncogene* 25 (2006) 5885–5897.
- 1480 [78] G. Iliakis, The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells, *Bioessays* 13 (1991) 641–648.
- 1481 [79] J.L. Roti Roti, W.D. Wright, Visualization of DNA loops in nucleoids from HeLa cells: assays for DNA damage repair, *Cytometry* 8 (1987) 461–467.
- 1482 [80] G. Speit, A. Hartmann, The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage, *Methods Mol. Biol.* 291 (2005) 85–95.
- 1483 [81] E.C. Woudstra, J.M. Roesink, M. Rosemann, J.F. Brunsting, C. Driessen, T. Orta, et al., Chromatin structure and cellular radiosensitivity: a comparison of two human tumour cell lines, *Int. J. Radiat. Biol.* 70 (1996) 693–703.
- 1484 [82] K. Rothkamm, M. Lobrich, Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low X-ray doses, *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* 100 (2003) 5057–5062.
- 1485 [83] C. Thomas, J. Charrier, C. Massart, M. Cherel, B. Fertil, J. Barbet, et al., Low-dose hyper-radiosensitivity of progressive and regressive cells isolated from a rat colon tumour: impact of DNA repair, *Int. J. Radiat. Biol.* 84 (2008) 533–548.
- 1486 [84] B. Marples, S.J. Collis, Low-dose hyper-radiosensitivity: past, present, and future, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 70 (2008) 1310–1318.
- 1487 [85] S. Vaganay-Juery, C. Muller, E. Marangoni, B. Abdulkarim, E. Deutsch, P. Lambin, et al., Decreased DNA-PK activity in human cancer cells exhibiting hypersensitivity to low-dose irradiation, *Br. J. Cancer* 83 (2000) 514–518.
- 1488 [86] M. Swift, D. Morrell, R.B. Massey, C.L. Chase, Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia, *N. Engl. J. Med.* 325 (1991) 1831–1836.
- 1489 [87] C. Badie, G. Iliakis, N. Foray, G. Alsheih, G.E. Pantellias, R. Okayasu, et al., Defective repair of DNA double-strand breaks and chromosome damage in fibroblasts from a radiosensitive leukemia patient, *Cancer Res.* 55 (1995) 1232–1234.
- 1490 [88] B.M. Pietrucha, E. Heropolitanska-Pliszka, A. Wakulinska, H. Skopczynska, R.A. Gatti, E. Bernatowska, Ataxia-telangiectasia with hyper-IgM and Wilms tumor: fatal reaction to irradiation, *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 32 (2010) e28–e30.

2.5. Article 5 : Radiosensibilité et polymorphismes : Comment progresser ?

Le développement récent des techniques de biologie intégrative à haut débit permet aujourd'hui une avancée considérable dans les recherches en biologie et en génétique. Les polymorphismes pour un nucléotide (ou SNPs) désignent des variations de séquences banales et fréquentes (au moins 10 % de fréquence allélique, soit 1 % de sujets homozygotes variants) touchant une seule base et pouvant éventuellement entraîner un changement fonctionnel mineur non délétère de la protéine. Mutations par substitution et SNPs sont donc biochimiquement identiques mais ont une répercussion fonctionnelle très différente. De nombreuses variations physiologiques interindividuelles peuvent être prédites, plus que par un SNP unique, par un ensemble de SNPs (de plusieurs gènes souvent) associé d'ailleurs au niveau d'expression des allèles concernés et de la régulation post traductionnelle des protéines. Ces corrélations peuvent être étudiées sur gènes candidats ou sur génome entier (GWAS) faisant appel des consortia amenés à constituer une banque tissulaire la plus homogène possible, à utiliser de puissants outils bioinformatiques et à suivre une méthodologie rigoureuse.

La radiosensibilité individuelle est la résultante de l'équipement protéique déployé par la cellule en réponse aux radiations ionisantes pour un individu donné. Elle se distribue de manière continue dans la population. Près de 200 études ont été publiées en 10 ans sur la relation entre SNPs et radiosensibilité soit par les approches de gènes candidats, soit plus récemment par des approches pan génomiques. De nombreux SNPs ont été confrontés à des critères variés offrant une vision parcellaire de la radiosensibilité in vitro ou in vivo. Il est ainsi douteux qu'une variation unique (booléenne) puisse refléter la diversité des faits biologiques et cliniques recouverts par le terme de radiosensibilité. Les associations de SNPs semblent plus pertinentes. Récemment pourtant, la méta analyse la plus importante du groupe de West sur 92 SNPs issus de 46 gènes différents ne montre aucune corrélation. De nombreuses contradictions apparaissent entre groupes de recherche et le possible pouvoir prédictif des SNPs n'est pas encore établi de façon rigoureuse en raison, en outre, de nombreux biais méthodologiques.

Conclusion pratique : Bien que quelques SNPs identifiés parmi les gènes intervenant dans le transport ou le métabolisme des médicaments anticancéreux se sont montrés intéressants en oncopharmacologie, aucun(e combinaison de) SNP ne peut aujourd'hui être rigoureusement considéré(e) comme prédictif(ve) de la radiosensibilité après la vérification de nombreux critères : nombre de patients statistiquement suffisant, évolutivité des liens statistiques avec la dose, modèle physiopathologique approprié. Cette quête doit donc progresser avec des outils adaptés, au même rythme (et non pas au détriment) d'autres approches plus anciennes certes mais dont la littérature montre des faisceaux convergents dans leur pouvoir prédictif.

Radiosensibilité et polymorphismes : Comment progresser ?

Guillaume Vogin^{1,2} et Nicolas Foray¹

¹*Institut national de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR1052 – Radiobiology Group, Cancer Research Centre of Lyon, 6900, Lyon, France;*

²*Centre Alexis Vautrin, Avenue de Bourgogne, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France;*

Pages: including:

Figures : 2

Tables : 1

*Correspondence to:

Dr. N. Foray

INSERM – UMR1052 – Groupe de Radiobiologie – Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), 28 Rue Laennec, 69008 Lyon France.

Tel: (33) 426556794; E-mail: Nicolas.foray@inserm.fr

Résumé

L'évaluation de la radiosensibilité individuelle et du risque de cancers radioinduits représente une attente sociétale réelle. Le développement récent des techniques en « omique » (génomique, protéomique, métabolomique, etc...) permet aujourd'hui une avancée considérable dans les recherches en biologie et en génétique. Les polymorphismes nucléotidiques simples (ou SNPs) désignent des changements de séquence d'une seule base qui n'entraînent pas de changements fonctionnels de la protéine. Cependant, près de 200 études ont été publiées en 10 ans sur la relation entre SNP et radiosensibilité. De nombreux SNPs ont été confrontés à des critères variés reflétant certains aspects de la radiosensibilité in vitro ou in vivo. Toutefois, à l'inverse de la nature booléenne des SNPs, la radiosensibilité n'est pas un phénomène de tout-ou-rien et évolue de façon complexe et continue avec la dose de radiation. De nombreuses contradictions apparaissent entre groupes de recherche et le possible pouvoir prédictif des SNPs n'est pas encore établi de façon rigoureuse. A la suite de débats lors de congrès de radiothérapie, cette revue a pour but de faire le point sur les données de la littérature concernant le lien entre SNP et radiosensibilité.

Abstract

The evaluation of individual radiosensitivity and of the risk of radiation-induced cancers is a current societal outcome. The recent development of the « omics » techniques (genomics, proteomics, metabolomics...) allows to date significant advances in biology and genetics. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are single-base sequence changes that do not significantly modify protein functions. Nevertheless, about 200 studies have been published in these last 10 years about the relationship between SNPs and radiosensitivity. Numerous SNPs have been tested with various criteria reflecting in vitro or in vivo radiosensitivity. However, unlike the Boolean nature of SNPs, radiosensitivity is not an all-or-none phenomenon and varies in a complex and continuous manner with radiation dose. A number of discrepancies have recently appeared in literature and the potential predictive power of SNP is still not established rigorously enough. After some debates between scientists during radiation oncology congresses, this review aims to provide a comprehensive review of the literature on the relationship between SNP and radiosensitivity.

Introduction

La prédiction de la radiosensibilité et plus généralement des effets biologiques et cliniques du stress génotoxique s'est toujours faite au gré des progrès technologiques et conceptuels mais aussi des effets de mode et de l'enthousiasme naturel des scientifiques pour les nouvelles techniques. En particulier, l'étude historique des différentes approches pour mesurer les dommages créés dans l'ADN par les agents toxiques et carcinogènes montre, avec le recul, que les choix méthodologiques, c'est-à-dire les techniques d'investigation, les modèles cellulaires, les doses de radiation ou les temps d'application du stress, peuvent conditionner très significativement l'interprétation des résultats [1, 2]. Le développement récent des techniques en « omique » (génomique, protéomique, métabolomique, etc...) ne fait pas exception à la règle et doit être également soumis à une critique constructive visant à détecter les artéfacts techniques pour mieux évaluer le pouvoir prédictif de chaque approche.

Aujourd'hui, la prédiction des effets secondaires potentiels de la radiothérapie et des cancers radioinduits constitue une attente sociétale réelle. Les approches qui consistent à rechercher des polymorphismes et vérifier si leur existence est corrélée avec la radiosensibilité sont abordées dans environ 200 articles publiés sur une période de 10 ans. Avec un tel recul, l'European Society for Radiotherapy and Oncology (ESTRO) avait organisé en 2012 lors de son 31^{ème} congrès un débat contradictoire sur le pouvoir prédictif des polymorphismes [3]. De même, l'impressionnante métaanalyse récente du groupe de CM West sur 92 polymorphismes issus de 46 gènes différents ne montre aucune corrélation entre polymorphismes et radiosensibilité [4]. Ainsi, en analysant scrupuleusement les publications concernées, cette revue tente d'apporter des réponses actualisées sur la relation entre polymorphismes et radiosensibilité.

Qu'appelle-t-on polymorphisme ?

Définition

Au sens étymologique, le terme *polymorphisme génétique* désigne l'existence de différences (notamment de séquences de l'ADN) au sein de mêmes groupes, espèces ou populations. Aujourd'hui, on parle surtout de polymorphismes nucléotidiques simples (ou SNPs) qui désignent des différences d'une seule base sans conséquence délétère. Elles sont le support, la plupart du temps, de variations phénotypiques mineures et expliquent les différences physiologiques individuelles. Notons que tous les polymorphismes ne sont pas de simples substitutions d'un nucléotide par un autre (SNP, single nucleotide polymorphism) : il existe des polymorphismes du nombre de répétitions de séquences micro- ou minisatellites, comme mentionné plus haut. Il existe également des variations du nombre de copies de certains gènes (CNV, pour copy number variations), que l'on peut considérer comme des polymorphismes et qui peuvent jouer un rôle important dans le niveau d'expression des gènes.

L'autre particularité des SNPs est leur fréquence. Il s'agit d'événements fréquents (au moins 10 % de fréquence allélique, soit 1 % de sujets homozygotes variants). Leur fréquence varie d'un gène à l'autre ; elle est plus élevée dans les introns que dans les exons. Sur chaque génome, on compte un SNP toutes les 100 à 300 bases. Cela signifie que chaque individu possède des dizaines de millions de SNPs et pour un gène donné, une dizaine de SNPs est possible [3]. Ainsi, si l'on souhaite vérifier le pouvoir prédictif des SNPs pour une manifestation clinique donnée, il faut s'assurer qu'il est statistiquement possible qu'*un seul SNP* soit corrélé au paramètre clinique considéré ou bien qu'un nombre *raisonnable* de SNPs puissent, *ensemble*, être prédictifs. Les études sur les SNPs doivent donc être accompagnées d'analyses biomathématiques rigoureuses afin de dégager les caractères significatifs liés aux paramètres biologiques et cliniques choisis.

SNPs ou mutations ?

Mutations par substitution et SNP sont ainsi biochimiquement identiques (remplacement d'un nucléotide par un autre) mais ont une signification très différente : on utilisera le terme de mutation pour les événements rares et délétères et le terme de polymorphisme pour les événements fréquents. Il faut insister sur le fait que même si un SNP entraîne un changement fonctionnel mineur de la protéine, il est moins évident qu'il soit la cause d'un tableau clinique significativement différent des porteurs de la séquence majoritaire. Certains SNPs peuvent toutefois concerner les promoteurs d'expression de gène mais toutes les fonctions ne sont pas liées à des changements d'expression. La confusion dans la littérature est d'autant plus grande qu'un nombre non négligeable d'études récentes parlent de SNPs alors qu'elles impliquent de vraies mutations ponctuelles où l'acide aminé varie et donc la séquence tridimensionnelle peut être affectée (Tableau 1) : la distinction entre ces mutations fonctionnelles et celles n'entraînant pas de changement d'acide aminé demeure rarement expliquée dans les publications.. De même, la transformation des cellules peut également influencer sur la présence de SNPs et de mutations. Par exemple, les lignées lymphoblastoïdes, produits de l'immortalisation des lymphocytes, montrent de nombreux réarrangements par rapport aux cellules d'origine du fait de l'hyperrecombinaison qu'entraîne la transformation et s'avèrent plus radiorésistants que les lymphocytes dont ils sont issus [6].

Choix des SNPs

Concernant les études sur la radiosensibilité, le choix des gènes d'intérêt, quand il est justifié dans les publications suit deux types de raisonnements :

- parce que les réactions tissulaires de radiosensibilité sont liées aux mécanismes de prolifération ou de l'évolution de l'inflammation, les auteurs ont choisis des gènes impliqués dans la réponse au stress tissulaire comme TGF β , GSTP1, GSTA1 (Tableau 1 ; Figure 1).
- parce que la radiosensibilité est liée à des dyfonctions de certaines voies de réparation de l'ADN, des SNP de gènes comme XRCC1, XRCC2, XRCC3 ont été choisis (Tableau 1). Toutefois, ce choix reste d'autant plus surprenant que, même s'ils sont impliqués dans la réparation des dommages de base et des cassures

simple-brin, ils ne figurent pas dans la longue liste des gènes dont les mutations causent la radiosensibilité chez l'homme [7] (Figure 1). On note donc ici une réelle confusion entre la réparation des cassures double-brin, seule à avoir été liée à la radiosensibilité et celle de cassures simple-brin ou de dommage de bases qui ne l'ont pas été chez les mammifères [8]. Le gène dont les mutations causent l'ataxie telangiectasie - le syndrome associé à la plus forte radiosensibilité connue porte quelques polymorphismes - . Toutefois, la majorité des études sur les SNPs d'ATM ne montre aucune corrélation avec la radiosensibilité (Tableau 1). Enfin, il faut noter que, bien que quelques SNPs de p53 ont été étudiés, il n'existe aucune corrélation entre les mutations de p53 et la radiosensibilité tissulaire : les patients p53 HOMOZYGOTES atteints du syndrome de Li-Fraumeni ne montrent pas particulièrement de réactions inhabituelles à la radiothérapie même s'ils ont un surrisque de cancer significatif [7] (Tableau 1).

Qu'appelle-t-on radiosensibilité ?

Histoire et définition

Le terme de radiosensibilité est apparu au début du XXème siècle pour désigner les réactions tissulaires suraigues observées par des traitements radiothérapeutiques, souvent associés d'abord au traitement de l'hypertrichose [9]. Progressivement, ce terme s'étendit pour traduire la notion de susceptibilité au cancer radio-induit, qui n'est pas causée par les mêmes phénomènes biologiques que la radiosensibilité tissulaire [10, 11]. Une telle confusion entre réactions tissulaires et prédisposition au cancer n'a pas facilité la recherche sur la réponse biologique aux radiations. Que ce soit en terme de toxicité ou de risque de cancer, la radiosensibilité n'est pas un phénomène de tout-ou-rien et de très nombreux niveaux de risques ont été observés : il existe un facteur de 1 à 40 entre des cellules hyper-radiosensibles et des cellules-hyper-radiorésistantes [7, 12]. Des patientes portant des mutations hétérozygotes de BRCA1 ont 4 à 5 fois plus de risque de faire un cancer radio-induit que d'autres [13].

In vivo, la radiosensibilité fut d'abord historiquement associée à l'apparition de radiodermites et plus généralement de réactions tissulaires toujours associées à des phénomènes d'inflammation [9]. *In vitro*, la radiosensibilité a été définie comme la perte définitive de capacité de la prolifération. En 1981, la survie clonogénique à 2 Gy des tumeurs a été corrélée quantitativement la radiocurabilité des tumeurs [14]. De même, la survie clonogénique de tissus sains irradiés a été corrélée quantitativement à la mortalité radioinduite observée *in vivo* chez les patients atteints de syndrome génétique [12]. Depuis les années 80, les bases moléculaires de la radiosensibilité ont constitué la principale voie de recherche des radiobiologistes afin de développer des tests prédictifs de la réponse aux radiations. Une telle quête aboutit à l'étude d'une multitude de paramètres cellulaires, cytogénétiques et moléculaires différents telles que les taux de micronoyaux, les taux de corps apoptotiques, les arrêts du cycle ou les taux de CDB non réparées [2]. En parallèle, les paramètres de radiosensibilité cliniques se multiplièrent également du fait de la diversité des réactions rencontrées. Les échelles cliniques de gravité des réactions tissulaires déclinées par organe se multiplièrent et se complexifièrent d'année en année, établissant un continuum entre effets précoces et tardifs. Ces échelles peuvent toutefois s'avérer délicates à utiliser en pratique et se montrent inadaptées dans certaines circonstances donnant lieu à des écarts de cotation entre deux praticiens indépendants. Par exemple dans le cas des radiodermites du sein, une réaction très sévère sur une petite surface est répertoriée systématiquement de plus bas grade qu'une réaction moins sévère sur une plus grande surface. La comparabilité des résultats peut s'en trouver affectée. Certains auteurs tentent de définir des échelles standardisées . La quantification de la radiosensibilité sur des bases fiables reste encore un défi [15]

Que signifie une corrélation entre un paramètre moléculaire et la radiosensibilité?

Malgré la diversité de paramètres *in vitro* ou *in vivo* reflétant la radiosensibilité, ils traduisent tous un fait important : la radiosensibilité n'est pas un phénomène de tout-ou-rien et les paramètres sont variables et évoluent avec la dose, les tissus et les individus. Cette variabilité s'oppose clairement à la nature booléenne du SNP (« on le porte ou on ne le porte pas »). *Ainsi, un seul SNP ne peut être responsable de toute la radiosensibilité.* C'est d'ailleurs oublier les très nombreux travaux qui tous, depuis les années 80 ont identifié des dizaines de protéines impliquées dans la réparation et la

signalisation des cassures double-brin dont les mutations aboutissent à une radiosensibilité [7, 8]. Même si les patients traités pour un cancer et montrant des réactions tissulaires sévères ne souffrent pas tous de syndromes génétiques connus, il apparaît que le caractère de diversité des réponses subsiste et suggère très fortement l'implication de plusieurs protéines [7]. Ainsi, toute corrélation établie entre un SNP et la radiosensibilité doit donc être vérifiée sur :

- 1. un nombre suffisant d'individus comparables
- 2. une gamme de dose suffisamment large pour vérifier l'évolution des caractères biologiques et cliniques
- 3. un nombre raisonnable de modèles tissulaires d'intérêt, c'est-à-dire directement lié au paramètre clinique (ex : peau pour les dermites ; rectum pour les rectites, etc...)

L'analyse des 200 publications éditées depuis 2000 sur le sujet montre qu'aucune ne vérifie l'ensemble de ces contraintes très lourdes. Toutefois, un nombre impressionnant de patients ont été analysés et, en dépit des cohortes requises, aucune corrélation évidente ne transparait car il existe de très nombreuses contradictions dans la littérature. Citons à nouveau le travail du groupe de CM West qui, avec son étude de 92 SNPs n'observe aucune corrélation avec la radiosensibilité [4].

Si un SNP unique ne peut être responsable de toute la radiosensibilité humaine, un nombre raisonnable d'entre eux peut-il pour autant refléter cette diversité et comment le montrer ? Même si les échelles de radiosensibilité tissulaire restent à affiner, prenons quelques exemples où les grades de sévérité ont été analysés. On peut imaginer qu'un SNP (ou une mutation) soit responsable directement d'un certain niveau de radiosensibilité : faisons l'hypothèse que les SNP A, B, C et D se retrouvent dans les lymphocytes de patients montrant respectivement après radiothérapie des réactions de grade 0, 1, 2, 3. La plupart du temps, alors que le nombre total de patients de la cohorte est suffisant, le nombre de patients dans chaque groupe de sévérité n'obéit pas systématiquement aux contraintes de la statistique ce qui appauvrit la corrélation entre A, B, C, D et les grades. Pour résoudre ce problème, la quasi-totalité des études considèrent les réactions de grade inférieur à 2 (0+1) et supérieur à 2 (2+3). Ce choix est notamment justifié par le fait qu'il est souvent difficile de distinguer une réaction de grade 1 avec l'absence de réaction. Toutefois, ce procédé entraîne de facto un biais majeur puisqu'il assimile

la radiosensibilité à un phénomène de tout-ou-rien (Figure 2). En plus de ce biais, comme le nombre de patients portant un SNP donné ET montrant également un grade donné est trop faible, les auteurs regroupent aussi les SNP en groupe A+B, C+D ou A+B+C+D [16]. Transformé également en phénomène de tout-ou-rien, l'appartenance à un groupe où les polymorphismes sont présents a plus de chance statistique d'être corrélée aux groupes 0+1 et 2+3 (Figure 2). Ainsi, l'analyse de la littérature suggère fortement qu'une meilleure connaissance des biais et des contraintes statistiques est nécessaire pour les études sur les SNPs.

SNP et radiosensibilité : trop de paramètres ?

Afin de mieux comprendre les biais, focalisons-nous sur les SNP de TGF β qui représentent la majorité des SNP étudiés pour leur lien éventuel avec la radiosensibilité (Tableau 1). Ce qui frappe dans le tableau 1, c'est la diversité des critères cliniques utilisés ainsi que le nombre d'études contradictoires. A part les publications d'un même groupe de recherche qui reprennent logiquement les travaux précédents, aucune étude ne partage la même méthodologie : les critères cliniques de la radiosensibilité sont souvent directement liés à la nature de l'organe considéré (ex : fibroses cutanés, capacité respiratoire, fonction érectile) ce qui limite toute intercomparaison. De même, le choix des SNPs et des mutations ne suit aucune règle et on note de nombreuses contradictions : dans l'étude de Kelsey et al (2012), le SNP 509 est corrélé au critère clinique mais pas avec la dose alors que le critère clinique est nécessairement lié à la dose [17] ; dans l'étude de Terrazino, le SNP 509 est lié à la présence de fibrose alors que le SNP 869 est lié à leur absence [18].

Conclusions

L'engouement des chercheurs pour l'analyse génomique aujourd'hui permise par une technologie impressionnante correspond à une tendance naturelle des chercheurs à utiliser toutes les approches utiles pour expliquer les phénomènes. La recherche des bases moléculaires et cellulaires de la radiosensibilité est un enjeu très important tant pour la prédiction des réactions tissulaires aiguës qui coûtent cher à la société que pour la prédiction des cancers radio-induits. Depuis plus de 50 ans, cette

quête a concerné successivement les outils cytogénétiques, les techniques de mesure des dommages de l'ADN et de mortalité cellulaire. L'utilisation de ces outils est inévitablement liée à des biais qu'il faut connaître et éviter. Jusqu'à présent ils étaient de nature biochimique (bonne isolation des cellules, respect des pH et des tampons, phénomènes de chevauchement dans les spectres d'immunofluorescence, etc...), statistique (nombre de cellules, de chromosomes, de cassures, etc...) et méthodologique (influence de la dose, du modèle cellulaire, du temps de réparation, etc...). Avec l'étude des SNPs s'ajoute un biais conceptuel : une seule modification de séquence qui n'entraîne pas forcément des changements fonctionnels peut-elle être à l'origine de la radiosensibilité ? Au vu des publications du domaine, aucun SNP ne peut aujourd'hui être rigoureusement considéré comme prédictif de la radiosensibilité après la vérification de nombreux critères. Cette quête doit donc progresser avec des outils adaptés, au même rythme (et non pas au détriment) d'autres approches plus anciennes certes mais dont la littérature montre des faisceaux convergents dans leur pouvoir prédictif.

Références

1. Foray N, Arlett CF, Malaise EP. Radiation-induced DNA double-strand breaks and the radiosensitivity of human cells: a closer look. *Biochimie* 1997;79:567-575
2. Granzotto A, Joubert A, Viau M, et al. Individual response to ionising radiation: what predictive assay(s) to choose? *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 2011;334:140-157
3. Andreassen CN, Dikomey E, Parliament M, West CM. Will SNPs be useful predictors of normal tissue radiosensitivity in the future? *Radiother Oncol* 2012;105:283-288
4. Barnett GC, Coles CE, Elliott RM, et al. Independent validation of genes and polymorphisms reported to be associated with radiation toxicity: a prospective analysis study. *Lancet Oncology* 2012;13:65-77
5. Reuther S, Metzke E, Bonin M, Petersen C, Dikomey E, Raabe A. No effect of the transforming growth factor beta1 promoter polymorphism C-509T on TGFB1 gene expression, protein secretion, or cellular radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*;85:460-465
6. Cole J, Arlett CF, Green MH, et al. Comparative human cellular radiosensitivity: II. The survival following gamma-irradiation of unstimulated (G0) T-lymphocytes, T-lymphocyte lines, lymphoblastoid cell lines and fibroblasts from normal donors, from ataxia-telangiectasia patients and from ataxia-telangiectasia heterozygotes. *Int J Radiat Biol* 1988;54:929-943
7. Foray N, Verrelle P. Réparations et réparatoses: entre modèles moléculaires et réalité clinique. *Bulletin du Cancer* 2011;mars, in press
8. Jeggo PA, Lobrich M. DNA double-strand breaks: their cellular and clinical impact? *Oncogene* 2007;26:7717-7719
9. Foray N, Colin C, Bourguignon M. 100 years of individual radiosensitivity: how we have forgotten the evidence. *Radiology* 2012;264:627-631
10. ICRP. *2006 Recommendations 2006 of the International Commission on Radiological Protection. Publication ICRP N. 103. Annual ICRP Publications, Vol.37.* Oxford: Pergamon Press, 2007
11. ICRP. The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP publication 103. *Ann ICRP* 2007;37:1-332
12. Deschavanne PJ, Fertil B. A review of human cell radiosensitivity in vitro. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996;34:251-266
13. Pijpe A, Andrieu N, Easton DF, et al. Exposure to diagnostic radiation and risk of breast cancer among carriers of BRCA1/2 mutations: retrospective cohort study (GENE-RAD-RISK). *Bmj*;345:e5660
14. Fertil B, Malaise EP. Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1981;7:621-629
15. Barnett GC, West CM, Coles CE, et al. Standardized Total Average Toxicity score: a scale- and grade-independent measure of late radiotherapy toxicity to facilitate pooling of data from different studies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012;82:1065-1074
16. Zschenker O, Raabe A, Boeckelmann IK, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in ATM, GSTP1, SOD2, TGFB1, XPD and XRCC1 with clinical and cellular radiosensitivity. *Radiother Oncol* 2010;97:26-32
17. Kelsey CR, Jackson IL, Langdon S, et al. Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms and Radiation Sensitivity of the Lung Assessed With an Objective Radiologic Endpoint. *Clin Lung Cancer*
18. Terrazzino S, La Mattina P, Gambaro G, et al. Common variants of GSTP1, GSTA1, and TGFbeta1 are associated with the risk of radiation-induced fibrosis in breast cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012;83:504-511

Tableau 1

Référence	Polymorphisme de TGB1 concerné	« vrai polymorphisme » ?	Cohorte et Modèle cellulaire	Critères pour la radiosensibilité	Plusieurs doses d'étude ?	Conclusion
Reuther et al. 2012	rs1800469 C509T	oui	Lymphocytes issus de 124 patientes traitées pour un cancer du sein Fibroblastes	Délétions chromosomiques pour les lymphocytes et survie clonogénique à 6 Gy pour les fibroblastes	non	Pas de corrélation Entre SNP et radiosensibilité Entre SNP et modèle cellulaire Entre Expression et radiosensibilité
Zschenker et al. 2010	rs1800469 C509T	oui	Lymphocytes issus de 47 patientes atteintes de cancer du sein	Chromosome aberrations	non	Pas de corrélation Entre SNP et radiosensibilité Entre SNP et modèle cellulaire
Barnett et al., 2012			Lymphocytes issus de 976 patientes traitées pour un cancer du sein et 637 patients pour un cancer de la prostate			
Terrazzino et al 2012 [18]	rs1800469 C509T rs1982073 Pro869Leu	Oui non	Lymphocytes issus de 257 patientes traitées pour un cancer du sein	Grades de Fibroses cutanées (échelle SOMA-LENT)	non	Corrélation entre C509T et fibroses grade 2-3 : corrélation entre T869C et no fibrosis
Kelsey et al 2012 [17]	Rs1800820 C988A Rs1800468 G800A Rs1800469 C509T Rs1800470 Pro869Leu Rs1800471 Arg941Pro Rs1800472 Thr1655Ile	Oui Oui Oui Non Non Non	Lymphocytes issus de 39 patients traités pour un cancer du poumon Courbe dose-réponse basé sur ???	Perfusion mesurée par SPECT	non	Corrélation entre C509T et la dose réponse Aucune corrélation entre la dose recue et C509T

				pneumonie				Aucune corrélation avec les autres SNP
Alisbeih et al. ? 2010								
Yuan et al 2009	Rs1800470 Pro869Leu	Non		Pneumonie radioinduite	Pneumonie radioinduite			Corrélation avec 869 Aucune corrélation avec C509T ni 941
Landmark-Hoyvik et al. 2011								
Barnett et al. ? 2010								
Giropoulos et al 2007 ???					Fibrose du sein			Corrélation avec 509
Chang-Claude et al 2009 ???								
Peters et al 2008					Fonction érectile			Corrélation avec 509 et 869 et 941 pour fonction érectile
					Saignement			Corrélation avec 509 pour saignement
Yoon et al 2006								
Quarimby et al 2003					Fibrose du sein			Corrélation avec 509 et 869 Aucune
								Corrélation avec 800 et 941
Kuptsova et al 2008 ???								
De ruyck et al					Severe complication			Corrélation avec 869 et 509 mais

								pas avec 800 941 et 1629
Andraassen et al 2005				Apparence du sein				Corrélation avec 869 et 509 Aucune corrélation avec 941
Andraassen et al 2003								

Revue d'andraassen

2.6. Article 6 : Impact du transit cyto-nucléaire de la protéine ATM en réponse à la radiothérapie : vers une classification moléculaire de la radiosensibilité humaine

Contexte : Les réactions tissulaires sévères observées pendant ou après RT représentent un enjeu clinique et sociétal majeur. Pourtant il n'existe toujours pas de paramètre radiobiologique consensuel qui permette de prédire la radiosensibilité individuelle de manière fiable. Depuis 2003, nous avons collecté plus de cent biopsies de patients ayant développé des réactions tissulaires sévères indépendamment de la chronologie, du grade de toxicité et de la localisation tumorale irradiée. L'objectif de cette étude était de rechercher des corrélations inter individuelles entre des paramètres moléculaires d'intérêt et la sévérité des toxicités présentées par les patients et évaluées selon les échelles CTCAE v4.0 et RTOG.

Matériels et méthodes : Des expériences d'immunofluorescence indirecte ont été réalisées et répétées à deux reprises sur une collection de lignées primaires fibroblastiques humaines non transformées établie à partir de 11 patients radio résistants, 6 patients hyper radiosensibles (réparatose) et 100 patients ayant présenté une réaction tissulaire inhabituellement sévère. Ces lignées ont été préalablement irradiées à la dose unique de 2 Gy. Une cinétique du nombre de micronoyaux, de foci nucléaires γ H2AX et a été réalisée à 10 min et 1, 4, 24 h post irradiation. Ces biomarqueurs reflètent différentes étapes de la reconnaissance et de la réparation des CDB. Leur valeur a été confrontée au grade des toxicités observées.

Résultats : Les patients ayant présenté une réaction tissulaire inhabituellement sévère n'ont pas nécessairement présenté de déficit de signalisation ou réparation des CDB. En revanche ces patients accusent systématiquement un retard de transit cyto-nucléaire de la protéine ATM requise sur site pour une reconnaissance optimale des CDB. Le nombre de micronoyaux, de foci nucléaires γ H2AX et pATM semble lié au grade de sévérité des réactions présentées. Les fonctionnalités de la reconnaissance et de la réparation des CDB doivent toutes deux être évaluées pour permettre de discriminer au mieux la radiosensibilité individuelle des patients.

Conclusions : Le nombre de CDB non réparées ne serait finalement pas le déterminant de la radiosensibilité le plus puissant. Nos résultats viennent appuyer et améliorer la classification générale de la radiosensibilité humaine en 3 groupes que nous avons décrite dans nos travaux précédents. L'incidence de chaque groupe dans cette population de patients a été étudiée.

Impact of ATM nucleo-cytoplasmic shuttling in response to radiation: towards a molecular classification of human radiosensitivity

Adeline Granzotto^{1*}, Guillaume Vogin^{1,2*}, Clément Devic¹, Mélanie Ferlazzo¹, Larry Bodgi^{1,3}, Laurène Sonzogni¹, Muriel Viau¹, Aurélie Etaix¹, Karim Malek¹, Marie-Thérèse Zobot⁴, Aurélie Joubert⁵, Anne Vincent¹, Nicole Dalla Venezia¹, Michel Bourguignon⁶, Edmé-Philippe Canat⁷, Bernard Talon⁷, Anne D'Hombres⁸, Ronan Tanguy⁸, Estelle Thébaud⁹, Pierre Souteyrand¹⁰, Daniel Orbach¹¹, Dominique Stoppa-Lyonnet¹¹, Raouf Radgi¹², Eric Doré¹³, Yoann Pointreau¹⁴, Carmen Llacer-Moscardo¹⁵, Céline Bourgier¹⁵, Pierre Leblond¹⁶, Anne-Sophie Defachelles¹⁶, Cyril Lervat¹⁶, Stéphanie Guey¹⁷, François Gilsoul¹⁸, Claire Berger¹⁹, Coralie Montcharmont¹⁹, Marie-Virginie Moreau-Claeys², Nicole Chavaudra²⁰, Isabelle Martel-Lafay²¹, Cécile Laude²¹, Ngochanh Haudesbat²¹, Amira Ziouéche²¹, Frédéric Baleyrier²¹, Bertrand Fleury²¹, Marie-Pierre Sunyach²¹, Séverine Racadot²¹, Pascal Pommier²¹, Line Claude²¹, Renaud de Crevoisier²², David Azria¹⁵, Jean-Marc Simon¹⁷, Pierre Verrelle²³, Yazid Belkacemi²⁴, Jean Bourhis²⁵, Eric Lartigau¹⁶, Christian Carrie²¹, Alain Puisieux¹, Jean-Léon Lagrange²⁴, Jacques Balosso²⁶, Nicolas Foray^{1§}

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

* The two authors have equally contributed to this work

Running title: ATM nucleo-shuttling and clinical radiosensitivity

Keywords: radiosensitivity, tissue reactions, ATM nucleo-shuttling, DSB repair

Conflict of interest : none

Pages: 29

Figures: 6

In supplementary data : Figure 7

§Reprint request to: Dr. Nicolas Foray - Inserm, UMR 1052, Groupe de Radiobiologie, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Bâtiment Cheney A, 69008 Rue Laennec, Lyon, France. Email : Nicolas.foray@inserm.fr

Abstract

Purpose: While the post-radiotherapy over-reactions (OR) represent a clinical and societal issue, there is still no consensual radiobiological parameter to reliably predict clinical radiosensitivity. From 2003, we have collected more than two hundreds skin biopsies from OR patients treated against different tumor localizations and having showed a wide range of radiosensitivity. The aim of the present paper was to establish links between molecular and clinical parameters of RT-induced toxicity by considering the CTCAE and RTOG grade as endpoint of clinical radiosensitivity, independently of tumor localization.

Methods and materials: Triplicate immunofluorescence experiments were performed on a collection of skin fibroblasts from 11 radioresistant, 6 hyper-radiosensitive and 100 OR patients, irradiated at a single dose of 2 Gy and observed 10 min and 1, 4, 24 h post-irradiation: the numbers of micronuclei, γ H2AX and pATM nuclear foci - that reflect different steps of DSB recognition and repair - were assessed and plotted against OR severity scores.

Results: OR patients did not necessarily show any gross DSB repair defect, which is in discrepancy with the actual paradigm that DSB repair alone is the best radiosensitivity predictor. Conversely, OR patients elicited a systematic delay of the nucleo-cytoplasmic shuttling of the ATM protein required for a complete DSB recognition. When plotted against severity score, the numbers of micronuclei and γ H2AX and pATM nuclear foci suggest a link with clinical radiosensitivity but the best discrimination among OR patients is provided when both DSB recognition and DSB repair are considered.

Conclusions: Our results are consistent with a general classification of human radiosensitivity based on three groups: radioresistance (group I); moderate radiosensitivity caused by delay of nucleo-shuttling of ATM which includes OR patients (group II) and hyper-radiosensitivity caused by a gross DSB repair defect (group III). The incidence of each group was discussed.

Introduction

Among the patients treated with radiotherapy (RT), up to 25% can exhibit some tissue over-reactions (OR), which limits the application of the scheduled treatment and increases the morbidity (1,2). OR cover a large spectrum of clinical presentations but the most frequent are dermatitis and proctitis during or after breast and prostate treatment, respectively. Furthermore, while OR were longer divided into *early*- and *late-occurring* ones, the development of innovative anti-cancer strategies has complicated these two categories: there is now evidence that OR cover both continuous time and severity spectra (3).

Despite considerable efforts to define OR severity scales, there is still no objective, quantifiable and consensual clinical parameter to describe and predict OR so that such reactions are termed unusual by the only experience of the clinician (4,5). Furthermore, since some OR may be equivalent to the reactions expected on normal tissues after over dosage, it was suggested that OR are mainly due to radiation delivery errors. However, OR are likely to be more frequent than radiation accidents. Besides, the RT accident in Epinal (France) showed that, with the same 20% dose excess delivered to prostate cancer patients, a large spectrum of OR intensities was observed systematically, strongly suggesting the impact of individual radiosensitivity. Reliable predictive assays based on biological parameters are therefore needed to predict OR(6).

To date, strong arguments support that unreparable DNA double-strand breaks (DSB) are the basis of radiosensitivity: 1) Cytogenetics support that micronuclei and unrepaired chromosome breaks, both consequences of unrepaired

DSB, are quantitatively correlated with radiosensitivity (7); 2) Quantitative correlations were obtained between cell survival and DSB repair (8,9); 3) The syndromes caused by mutations of DSB repair proteins are systematically associated with radiosensitivity (10,11). The ATM kinase, whose mutations causes ataxia telangiectasia, the most radiosensitive human syndrome, is upstream the major DSB repair and signaling pathway (12,13). Despite these arguments and due to the variety of techniques, the choice of experimental conditions (doses, repair times, cell types) and the complexity of DSB repair mechanisms, there is still no consensus on the appropriate(s) DSB repair parameter(s) to reliably predict radiosensitivity .

Interestingly, some genetic diseases such as progeroid syndromes (14), Bruton disease (15), neurofibromatosis (16), Huntington disease (17) or Usher syndrome (18) that are caused by mutations of cytoplasmic proteins not directly involved in DSB repair show moderate but significant radiosensitivity, suggesting the transport of some signal from cytoplasm to nucleus after irradiation (16-18). Interestingly, our last report on Huntington disease showed that mutated huntingtin sequesters the ATM kinase in cytoplasm, limiting DSB recognition and repair in the nucleus. Pre-treatment of cells with Hydroxymethylglutaryl-CoA Reductase Inhibitors accelerates ATM nucleo-cytoplasmic shuttling thus increasing DSB recognition, DSB repair and radiation resistance. These facts suggest that ATM transport has an impact on radiation response (17).

,Our group has accumulated from 2003 more than 100 skin-derived fibroblast lines from patients who have experienced various OR after RT against different cancer types. The aim of the present paper was to investigate correlations between molecular and clinical parameters of RT-induced toxicity by considering the CTCAE and RTOG scale grades as endpoints of clinical radiosensitivity, independently from

the localization of the treated tumor. Indirect immunofluorescence techniques were systematically applied to fibroblasts irradiated at 2 Gy and observed at 10 min and 1, 4, 24 h post-irradiation: the yields of micronuclei and γ H2AX and pATM nuclear foci that reflect different steps of DSB recognition and repair were assessed and plotted against OR severity scores. Results were compared to the data obtained from radioresistant and hyper-radiosensitive (ATM- and LIG4-mutated) human fibroblasts.

Methods and Materials

Patients and skin fibroblasts

This study was conducted on 117 skin fibroblasts derived from 100 OR patients and 12 radioresistant, 4 ATM-mutated and 1 LIG4-mutated cells lines. Clinical data on tumor characteristics and therapy plans were extracted from the medical records. Further details are gathered in tables 1 (Supplementary data). The tissue severity was assessed according to the CTCAE v4.0 and early and late RTOG scales. All the patients were properly informed and signed written consent according to the ethical recommendations. This study was approved by Ethical Committee and the cell lines were declared under the number RC585 to Ministry of Research as human samples. Skin biopsies were collected using a punch procedure in non irradiated areas after local anesthesia. After sampling, biopsies were placed in DMEM and cultured according standard procedures.

Irradiation

Skin fibroblasts were irradiated (2 Gy) in plateau phase to avoid any artifact due to cell cycle. All the irradiations were performed with gamma-radiation provided by standard medical accelerators as already described elsewhere (17).

Immunofluorescence

Protocol for survival curves and antibodies against pATM and γ H2AX proteins was previously described (8,17)

Statistical analysis and modeling

All the statistics and data analysis were performed with MathLab 7 (The Mathwork, Natick, MA) and Kaleidagraph 4.5 (Synergy Software, Reading, PA). The foci kinetics were fitted and analyzed by using the Bodgi's formula, detailed elsewhere (19). The correlation between radiobiological parameters and severity scores were examined using the linear regression method.

Results

The numbers of spontaneous micronuclei and DSB do not predict radiosensitivity

ATM kinase was shown to phosphorylate γ H2AX, visible as nuclear foci, and triggers its relocalization, considered as a DSB recognition step (20-22). Similarly, ATM dimers are auto(trans)phosphorylated forms that are also quantifiable as foci (23). By analyzing the numbers of spontaneous micronuclei, γ H2AX and pATM foci assessed in unirradiated cells, two distinguishable sub-populations appeared: the radioresistant cell lines on the one hand, and the OR+hyper-radiosensitive cell lines on the other hand. However, neither inter-individual difference inside the OR subpopulation or correlation with any morbidity score were observed. These conclusions did not change when grades were merged into two categories (0+1+2 vs. 3+4, data not shown). These data strongly suggest that spontaneous values do not predict radiosensitivity.

The radiation-induced micronuclei discriminate three sub-populations of patients

Radiation-induced micronuclei are the consequences of unrepaired DSB that propagate all along the cell cycle leading to irreversibly damaged chromosomal fragments and causing mitotic cell death (24). In human fibroblasts, since the production of radiation-induced micronuclei requires more than 4 h, their number after 2 Gy does not significantly vary from 10 min to 4 h post-irradiation (data not shown). Consequently, we only measured the number of radiation-induced micronuclei after 24 h post-irradiation. The number of residual micronuclei allow to

stratify three distinguishable sub-populations corresponding to the radioresistant, OR and hyper-radiosensitive patients ($p < 0.05$). Interestingly, the values of the thresholds that define each subpopulation correspond to those of the three groups of radiosensitivity that we have previously defined with well-characterized radiosensitive syndromes (8): group I: radioresistance; group II: moderate radiosensitivity and cancer proneness; group III: hyper-radiosensitivity (Fig. 2). However, although the number of residual micronuclei was found to be proportional to morbidity scores (whatever the OR scale), the quantitative correlation with grades was not significant statistically (Fig.2). A similar conclusion was reached when grades were merged into 2 categories (0+1+2 vs. 3+4) (data not shown).

The residual γ H2AX foci discriminate four sub-populations of patients

When the number of γ H2AX foci was plotted against repair time after 2 Gy, a great variety of DSB repair kinetics appeared (Fig. 3A). Through a rigorous mathematical analysis, we have proposed the “Bodgi’s formula” to describe the kinetics of appearance/disappearance of γ H2AX foci: after the DSB induction phase, the DSB recognition phase occurs, during which the number of foci increases. DSB repair follows with the decay of the number of foci (19). Five situations were identified, whether cells are provided from well-characterized genetic syndromes or not:

- among the cell lines that showed more than 70 γ H2AX foci 10 min after 2 Gy, the number of γ H2AX foci systematically decreased up to 24 h. In that case, DSB recognition is compatible with the commonly accepted DSB induction rate of about 40 DSB per Gy. However, the number of residual γ H2AX foci can be either lower than 3 (normal DSB recognition and complete DSB repair, group I, radioresistant cells) or higher than 8 (group IIIb, normal DSB

recognition and DSB repair deficiency, hyper-radiosensitive LIG4-mutated cells) (8);

- among the cell lines that showed less than 70 γ H2AX foci 10 min after 2 Gy, the DSB recognition can be considered as deficient. In this case, three situations were identified: 1) the number of γ H2AX foci decreased up to 24 h post-irradiation to reach values higher than 3 but lower than 8 (irreversible DSB recognition impairment, moderate DSB repair deficiency, moderate radiosensitivity, group IIa, some OR patients); 2) the number of γ H2AX foci increased up to 1 h and then decreased continuously to reach values higher than 3 but lower than 8 (delayed DSB recognition, moderate DSB repair deficiency, moderate radiosensitivity, group IIb, some OR patients); 3) the number of γ H2AX foci is nearly negligible, DSB are not recognized and therefore not repaired by NHEJ (no DSB recognition, gross DSB repair deficiency, hyper-radiosensitivity, group IIIb, ATM-mutated cells (8) (Fig. 3A).

From the above description, it appeared that the number of γ H2AX foci after 10 min, 1 or 4 h post-irradiation could not properly predict the radiosensitivity of all the cells of the collection (data not shown). Conversely, the number of residual γ H2AX foci discriminated 4 subpopulations, in agreement with previous studies (8,19): group I (radioresistant), group II (OR), group IIIa (ATM-mutated) and group IIIb (LIG4-mutated patients). Interestingly, proportionality can be identified between the number of residual γ H2AX foci and toxicity score. Again, the correlation with the CTCAE (Fig. 3B) and RTOG (Fig.3C) grades inside the OR patients subgroup was not significant. A similar conclusion was reached when grades were merged into 2 categories (0+1+2 vs. 3+4) (data not shown). Although encouraging, these data show that the

number of residual DSB alone is not a satisfactory predictor of radiosensitivity linked to OR.

The analysis of pATM foci suggests a radiation-induced nucleo-cytoplasmic shuttling of ATM that is a common feature of OR patients

The statement that about 40 DSB are induced per Gy per human diploid cell has been abundantly documented in literature (25,26). Hence, the fact that a majority of cells of the collection show less radiation induced DSB than expected cannot be explained by physical considerations or by inter cell type variation of nuclear volume (Fig.4A). Besides, ancillary data did show that OR patients cells elicit a normal DSB induction rate by using pulsed field gel electrophoresis technique (25,26) and a normal ATM expression (data not shown). Since H2AX phosphorylation requires ATM kinase activity, these results suggest some impairment of an ATM-dependent DSB recognition process. Interestingly, from some fibroblasts of the collection that are provided from well-known characterized syndromes, the pATM localization after irradiation elicit some differences with the radioresistant controls, suggesting that ATM diffuses from cytoplasm to nucleus (17,19). In order to investigate the role of ATM localization in the radiosensitive cells, pATM immunofluorescence was systematically applied to the cell lines in the same conditions as γ H2AX experiments. pATM is essentially distributed in the cytoplasm in non-irradiated cells, whatever the radiosensitivity (Fig 4B). After irradiation, as γ H2AX, pATM foci kinetics also respects Bodgi's formula (Fig.4C). Interestingly, the number of pATM foci is systematically found two times lower than that the number of γ H2AX foci (Fig.4C). In parallel with the increase of the number of pATM foci in the nucleus, immunoblots from

cytoplasmic and nuclear extracts confirm that some pATM forms become nuclear, suggesting ATM nucleo-cytoplasmic shuttling (Fig.4B).

Since OR patients cells showed very different ATM foci kinetics at early post-irradiation times, it was not surprising that the number of pATM foci after 10 min and 1h post-irradiation was not correlated with CTCAE (Fig 5A,B) or RTOG grade (data not shown). Conversely, the maximal number of ATM foci chosen between 10 min and 1h discriminated all the grades and was the best predictor of this study (Fig. 5C). When grades were gathered into 2 categories (0+1+2 vs. 3+4), the maximal number of ATM foci provides a significant prediction of radiosensitivity among the OR patients.

Both γ H2AX and pATM foci are required for a better description of radiosensitivity

The residual γ H2AX foci number more likely reflects DSB repair deficiency while the number of early pATM foci reflects DSB recognition. Since radiosensitivity seems to result from relative impairments in both processes, the corresponding numbers of residual γ H2AX and pATM foci were plotted together in the same graph. The resulting figure provides the best way to discriminate OR sub-groups (Fig 6A.), suggesting that both ATM nucleo-cytoplasmic shuttling (DSB recognition) and DSB repair data are required to describe all the range of human radiosensitivity. Interestingly, some natural limits appeared with respect to the ratio between DSB recognition and DSB repair defects. For example, there is no radiosensitive cell line showing normal DSB repair but impaired DSB recognition or normal DSB recognition but impaired DSB repair (Fig. 6B). Hence, Fig.6B shows the occurrence domains of radiosensitivity. Whereas the probability of belonging to a given group is proportional

to the inverse of the corresponding confidence areas, the normalized incidence of each group was deduced (Fig. 6C). While this hypothesis fits with a gaussian distribution of the radio sensitivity groups, it appears that the estimated incidence of group II (to which the majority of OR patients belong) is in agreement with literature (i.e. about 25% of patients) (see Introduction). Obviously, further experiments are required to better evaluate the incidence of each of these groups.

Discussion

Justification of the methodology

A global approach: The goal of the present paper was to establish quantitative links between molecular and clinical radiosensitivity considering tissue toxicity scores as endpoints of clinical radiosensitivity, independently from the localization of the treated tumor and the early or late nature of the reactions. One could oppose the fact that a given score may correspond to different tissue reactions on different localizations whose link is not necessarily obvious (ex: telangiectasia vs. hair loss). However, by considering each tumor localization separately, the link established between molecular and clinical features do not vary significantly from the global approach (data not shown). Conversely, when the tissue reactions are expected to be nearly an all-or-none phenomenon (alike the frequency grade-3 or -4 toxicity observed in ear-nose and throat tumors due to dose/volumes applied), the sensitivity and the specificity of our assays are even reinforced (data not shown). Similar global approaches were applied to consider the intrinsic radiosensitivity as a general notion (27). Lastly, we have deliberately chosen to consider correlations with severity grades taken separately. Indeed, while nearly all the published studies dealing with predictive assays of radiosensitivity dichotomized the grades into two arbitrary categories (0+1+2 vs 3+4), we endeavored to examine the corresponding radiobiological values for each grade. Altogether, these data support that the prediction of radiosensitivity can be based on molecular hypotheses, independently from the localization of the irradiated zone and the treated tumor, considering that there is no particular DSB repair and signaling pathways that would be tissue-specific.

Choice of the cellular model: For practical reasons, the great majority of experiments performed in the field of gene expression and mutations are performed with blood cells. However, RT-induced reactions concern more preferentially conjunctive, endothelial or epithelial tissues rather than lymphocytes. Even if the choice of blood cells is mainly based on practical considerations and quickness of analyse, it raises therefore the question of the actual existence of a causal correlation between data from lymphocytes and the severity of tissue reactions. This choice is inasmuch crucial as blood cells are naturally more prone to apoptosis than fibroblasts for example. Besides, our data show here that radiosensitivity can be predict from cellular models (fibroblasts) than do not show apoptosis even for hyper-radiosensitive cases. Furthermore, the estimation of intrinsic radiosensitivity of blood cells (quantified by clonogenic survival) is limited by the reduced life of circulating lymphocytes or requires EBV-transformation that may corrupt the assessment of radiosensitivity (transformed cells are generally more radioresistant than their untransformed counterparts) (28). In 1990, Kushiro et al. did not find any correlation between radiosensitivity of fibroblasts and lymphocytes (29). In 1991, from quiescent skin and blood cells of 34 non-radiosensitive donors, Green et al. demonstrated significant differences in radiosensitivity with fibroblasts but not with T-lymphocytes (30). In 1992, from 30 human fibroblasts and 29 lymphocytes, Geara et al. concluded that there was no correlation between survival fractions assessed in lymphocytes and those assessed in fibroblasts, suggesting that tissue-specific characteristics, such as differentiation, may modulate radiosensitivity (31).

ATM nucleo-cytoplasmic shuttling at the molecular basis of radiosensitivity

The choice of the ATM-dependent DSB repair and signaling markers to predict radiosensitivity is warranted by a very solid documentation strongly supporting that unrepaired DSB are the key-event of radiation-induced cell lethality (32). The investigations on ATM are also justified by the major role that this protein plays in response to stress (13). ATM is commonly accepted to predominate in the nucleus. However, radiosensitivity can be observed in some cells characterized by a normal spontaneous ATM concentration in nucleus. This is notably the case of radiosensitive syndromes caused by mutations of cytoplasmic proteins (18). Particularly, our last report on Huntington disease showed that mutated huntingtin sequesters ATM in the cytoplasm, which delays its nucleo-cytoplasmic shuttling, limits DSB recognition, DSB repair and increases radiosensitivity as a consequence. A treatment with Hydroxymethylglutaryl-CoA Reductase Inhibitors and disphosphonates was shown to alleviate the delay of the nucleo-shuttling, stimulate DSB repair and increase radioresistance (17). Our more recent reports suggest that the radiation-induced flux of ATM monomers that enters in the nucleus is much important that the quantity of ATM proteins present in the nucleus before irradiation (Bodgi and Foray, submitted). Altogether, our data support that ATM nucleo-cytoplasmic shuttling is required for a normal radiation response (14,17). Besides, the fact that γ H2AX foci are systematically found twice more numerous than pATM ones is consistent with this hypothesis: two γ H2AX foci (one on each DNA end) are phosphorylated by two ATM monomers. Once DSB is repaired, both monomers associate together to form one autophosphorylated dimer revealed by one pATM focus (Fig. 7 Supplementary Data). One of the major conclusions of the present paper is that the cellular radiosensitivity of OR patients (even with grade 4 toxicity) cannot be considered as hyper-

radiosensitivity as shown in ATM-mutated patients but rather as moderate radiosensitivity as observed in cells derived from genetic syndromes like Bloom syndrome, Fanconi anemia, neurofibromatosis or Huntington disease (8,18). This statement encourages the definition of a classification of radiosensitive cases based on objective criteria, since the terms “radiosensitivity” or “hyperradiosensitivity” are generally used indifferently in literature (8,18,33). Radiosensitivity can thus be caused either by impairment of DSB recognition or impairment of DSB repair or both and at different at the cytoplasmic and/or nuclear level(s). So it made sense to consider two markers, at least, to predict a wide range of radiosensitivity. In 2008, we concluded that a combining immunofluorescence assay was required to predict radiosensitivity: targeting of both γ H2AX and MRE11 was proposed. Interestingly, MRE11 foci are also formed in an ATM-dependent manner (8).

The second major conclusion of this paper is that OR patients do not necessarily suffer from a significant DSB repair defect but systematically from a DSB recognition impairment reflected by a delay in the ATM nucleo-cytoplasmic shuttling. This conclusion is in clear disagreement with the commonly accepted paradigm that only the nuclear damage impacts the cell survival. In a previous report, we hypothesized that the delay of the ATM nucleo-cytoplasmic shuttling was caused by a sequestration of ATM by mutated cytoplasmic substrates (17,19). Since the delay of ATM transit appears to be a common feature of OR patients, it can be thought that the causes of radiosensitivity linked to OR may be mutations of cytoplasmic proteins that become ATM substrates. The resulting protein-protein complex may be not diffusible into the nucleus. Such requirements can be reached by a number of mutated proteins, which may be in agreement with a non-negligible proportion of OR

patients. Further investigations are required to identify these ATM neo-substrates to better predict cellular and clinical radiosensitivity.

Legend to figures

Fig.1: Number of micronuclei, γ H2AX and pATM foci as a function of the severity of the toxicity according to CTCAE v4.0 scale. Each plot represents the mean \pm SEM of three independent replicates. Open squares represent the mean \pm SD for each grade category.

Fig.2: Number of residual micronuclei as a function of the severity of toxicity according to CTCAE v4.0 or RTOG scales. Micronuclei were scored during immunofluorescence experiments via DAPI counterstaining after 2 Gy followed by 24 h for repair. Each plot represents the mean \pm SEM of three independent replicates. Open squares represent the mean \pm SD for each grade category. Linear regression ($p > 0.9$ each) was performed on radioresistant and OR data only. The group of radiosensitivity is indicated in roman characters.

Fig.3: Number of residual γ H2AX foci as a function of the severity of toxicity according to CTCAE v4.0 or RTOG scales. A. Representative examples of γ H2AX foci time-kinetics obtained from cells of the collection. For convenience error bars and plot markers were omitted for the 10 min, 1h, 4h and 24 h repair time data. B and C: The number of γ H2AX foci remaining 24 h after 2 Gy were plotted against the indicated severity grade. Linear regression ($p > 0.9$ each) was performed on radioresistant and OR data only. The group of radiosensitivity is indicated in roman characters. For all the panels, each plot represents the mean \pm SEM of three independent replicates and open squares represent the mean \pm SD for each grade category.

Fig.4: The pATM foci data suggest a nucleo-cytoplasmic shuttling of ATM. A. The number of pATM foci scored 10 min after 2 Gy are provided for all the cell lines of the collection: the dotted line indicates the normal DSB incidence of 40 DSB per Gy per cell. B. Representative pATM immunoblots of the pATM expression at the indicated timepoints after 2 Gy in the cytoplasm or in the nucleus. The corresponding immunofluorescence data are shown for unirradiated or irradiated (2Gy + 10 min) cells. C. Representative examples of pATM foci time-kinetics obtained from cells of the collection. For convenience, error bars and plot markers were omitted for the 10 min, 1h, 4h and 24 h repair time data. For the panels A and C, each plot represents the mean \pm SEM of three independent replicates and open squares represent the mean \pm SD for each grade category.

Fig.5: Number of residual pATM foci as a function of toxicity according to CTCAE v4.0 scale. A. The pATM foci were scored either after 2 Gy+10 min (A) or 2Gy+ 1h min (B). Panel C represent the maximal number of pATM between the two corresponding values shown in panels A and B. The group of radiosensitivity is indicated in roman characters. For all the panels, each plot represents the mean \pm SEM of three independent replicates and open squares represent the mean \pm SD for each grade category.

Fig.6: Radiosensitivity is determined by both DSB recognition and repair data. A. The average values of the number of γ H2AX and pATM foci shown in Fig. 3B and Fig. 5C, respectively, were plotted together. B. The information shown in panel A was reproduced in squared confidence areas. C. By considering that the probability of

belonging to a given group is proportional to the inverse of the corresponding confidence area, the normalized incidence of each group is represented as bars. Dotted line corresponds to the Gaussian curve that provides the best data fit ($r=0.9$).

Fig.7: A model explaining the ratio between the number of γ H2AX and pATM foci.

Acknowledgements

We thank the patients for their contribution. We thank Madame Beaufrère for her assistance in editing English and the Radiobiology Group staff. We are grateful to the Association Pour la Recherche sur l'Ataxie-Telangiectasie (APRAT), the Electricité-de-France (Comité de Radioprotection), the Plan Cancer/AVIESAN «Micromegas project», the Centre National d'Etudes Spatiales (CNES) and the Commissariat Général à l'Investissement (INDIRA project).

References

1. Turesson I, Nyman J, Holmberg E, Oden A. Prognostic factors for acute and late skin reactions in radiotherapy patients. *International Journal of Radiation Oncology Biology and Physics* 1996;36:1065-1075.
2. Gatti RA. The inherited basis of human radiosensitivity. *Acta Oncologica* 2001;40:702-711.
3. Dorr W, Hendry JH. Consequential late effects in normal tissues. *Radiother Oncol* 2001;61:223-231.
4. Trotti A, Colevas AD, Setser A, Rusch V, Jaques D, Budach V, Langer C, Murphy B, Cumberlin R, Coleman CN, Rubin P. CTCAE v3.0: Development of a comprehensive grading system for the adverse effects of cancer treatment. *Semin Radiat Oncol* 2003;13:176-181.
5. Cox JD, Stetz J, Pajak TF. Toxicity criteria of the radiation therapy oncology group (rtog) and the european organization for research and treatment of cancer (eortc). *International journal of radiation oncology, biology, physics* 1995;31:1341-1346.
6. Ash D. Lessons from epinal. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2007;19:614-615.
7. Cornforth MN, Bedford JS. A quantitative comparison of potentially lethal damage repair and the rejoining of interphase chromosome breaks in low passage normal human fibroblasts. *Radiation research* 1987;111:385-405.
8. Joubert A, Gamo K, Bencokova Z, Gastaldo J, Rénier W, Chavaudra N, Favaudon V, Arlett C, Foray N. DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response: At least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity? *International Journal of Radiation Biology* 2008;84:1-19.
9. Chavaudra N, Bourhis J, Foray N. Quantified relationship between cellular radiosensitivity, DNA repair defects and chromatin relaxation: A study of 19 human tumour cell lines from different origin. *Radiother Oncol* 2004;73:373-382.
10. Jeggo PA. Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiation research* 1998;150:S80-91.
11. McKinnon PJ, Caldecott KW. DNA strand break repair and human genetic disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2007;8:37-55.
12. Foray N, Marot D, Gabriel A, Randrianarison V, Carr AM, Perricaudet M, Ashworth A, Jeggo P. A subset of atm- and atr-dependent phosphorylation events requires the brca1 protein. *Embo J* 2003;22:2860-2871.
13. Lobrich M, Jeggo PA. The two edges of the atm sword: Co-operation between repair and checkpoint functions. *Radiother Oncol* 2005;76:112-118.
14. Varela I, Pereira S, Ugalde AP, Navarro CL, Suarez MF, Cau P, Cadinanos J, Osorio FG, Foray N, Cobo J, de Carlos F, Levy N, Freije JM, Lopez-Otin C. Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging. *Nat Med* 2008;14:767-772.
15. Huo YK, Wang Z, Hong JH, Chessa L, McBride WH, Perlman SL, Gatti RA. Radiosensitivity of ataxia-telangiectasia, x-linked agammaglobulinemia, and related syndromes using a modified colony survival assay. *Cancer research* 1994;54:2544-2547.
16. Hannan MA, Sackey K, Sigut D. Cellular radiosensitivity of patients with different types of neurofibromatosis. *Cancer genetics and cytogenetics* 1993;66:120-125.
17. Ferlazzo ML, Sonzogni L, Granzotto A, Bodgi L, Lartin O, Devic C, Vogin G, Pereira S, Foray N. Mutations of the huntington's disease protein impact on the atm-dependent signaling and repair pathways of the radiation-induced DNA double-strand breaks: Corrective effect of statins and bisphosphonates. *Molecular neurobiology* 2014;49:1200-1211.
18. Deschavanne PJ, Fertil B. A review of human cell radiosensitivity in vitro. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 1996;34:251-266.
19. Bodgi L, Granzotto A, Devic C, Vogin G, Lesne A, Bottollier-Depois JF, Victor JM, Maalouf M, Fares G, Foray N. A single formula to describe radiation-induced protein relocalization: Towards a mathematical definition of individual radiosensitivity. *J Theor Biol* 2013;333:135-145.
20. Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. Atm phosphorylates histone h2ax in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 2001;276:42462-42467.

21. Rothkamm K, Lobrich M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100:5057-5062.
22. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone h2ax phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 1998;273:5858-5868.
23. Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates atm through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 2003;421:499-506.
24. Grote SJ, Joshi GP, Revell SH, Shaw CA. Observations of radiation-induced chromosome fragment loss in live mammalian cells in culture, and its effect on colony-forming ability. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1981;39:395-408.
25. Foray N, Priestley A, Alsbeih G, Badie C, Capulas EP, Arlett CF, Malaise EP. Hypersensitivity of ataxia telangiectasia fibroblasts to ionizing radiation is associated with a repair deficiency of DNA double-strand breaks. *Int J Radiat Biol* 1997;72:271-283.
26. Foray N, Arlett CF, Malaise EP. Radiation-induced DNA double-strand breaks and the radiosensitivity of human cells: A closer look. *Biochimie* 1997;79:567-575.
27. Fertil B, Malaise EP. Intrinsic radiosensitivity of human cell lines is correlated with radioresponsiveness of human tumors: Analysis of 101 published survival curves. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 1985;11:1699-1707.
28. Cole J, Arlett CF, Green MH, Harcourt SA, Priestley A, Henderson L, Cole H, James SE, Richmond F. Comparative human cellular radiosensitivity: li. The survival following gamma-irradiation of unstimulated (g0) t-lymphocytes, t-lymphocyte lines, lymphoblastoid cell lines and fibroblasts from normal donors, from ataxia-telangiectasia patients and from ataxia-telangiectasia heterozygotes. *Int J Radiat Biol* 1988;54:929-943.
29. Kushiuro J, Nakamura N, Kyoizumi S, Nishiki M, Dohi K, Akiyama M. Absence of correlations between radiosensitivities of human t-lymphocytes in g0 and skin fibroblasts in log phase. *Radiation research* 1990;122:326-332.
30. Green MH, Arlett CF, Cole J, Harcourt SA, Priestley A, Waugh AP, Stephens G, Beare DM, Brown NA, Shun-Shin GA. Comparative human cellular radiosensitivity: lii. Gamma-radiation survival of cultured skin fibroblasts and resting t-lymphocytes from the peripheral blood of the same individual. *Int J Radiat Biol* 1991;59:749-765.
31. Geara FB, Peters LJ, Ang KK, Wike JL, Sivon SS, Guttenberger R, Callender DL, Malaise EP, Brock WA. Intrinsic radiosensitivity of normal human fibroblasts and lymphocytes after high- and low-dose-rate irradiation. *Cancer research* 1992;52:6348-6352.
32. Jeggo PA, Lobrich M. DNA double-strand breaks: Their cellular and clinical impact? *Oncogene* 2007;26:7717-7719.
33. Foray N, Colin C, Bourguignon M. 100 years of individual radiosensitivity: How we have forgotten the evidence. *Radiology* 2012;264:627-631.

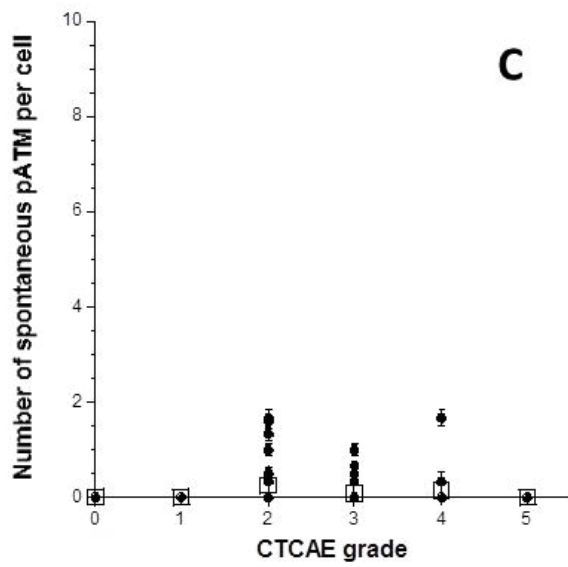
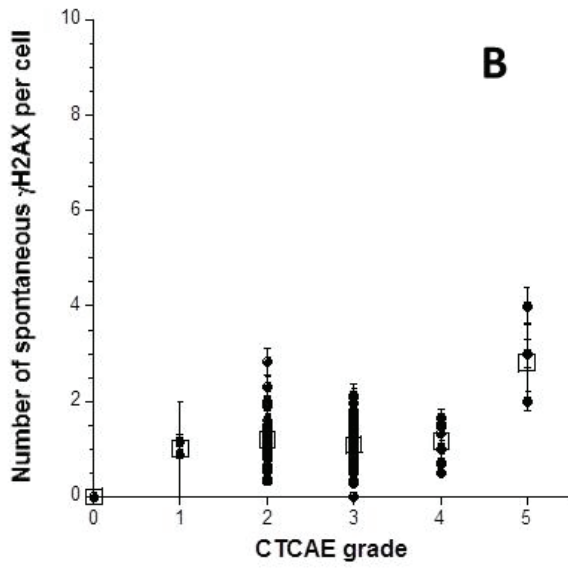
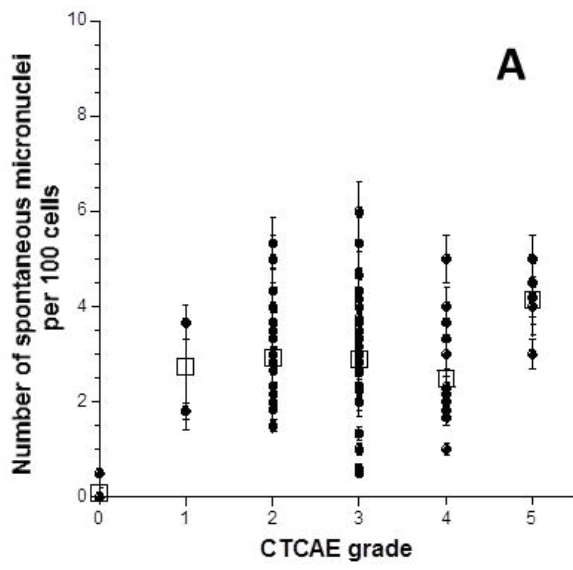


Fig. 1

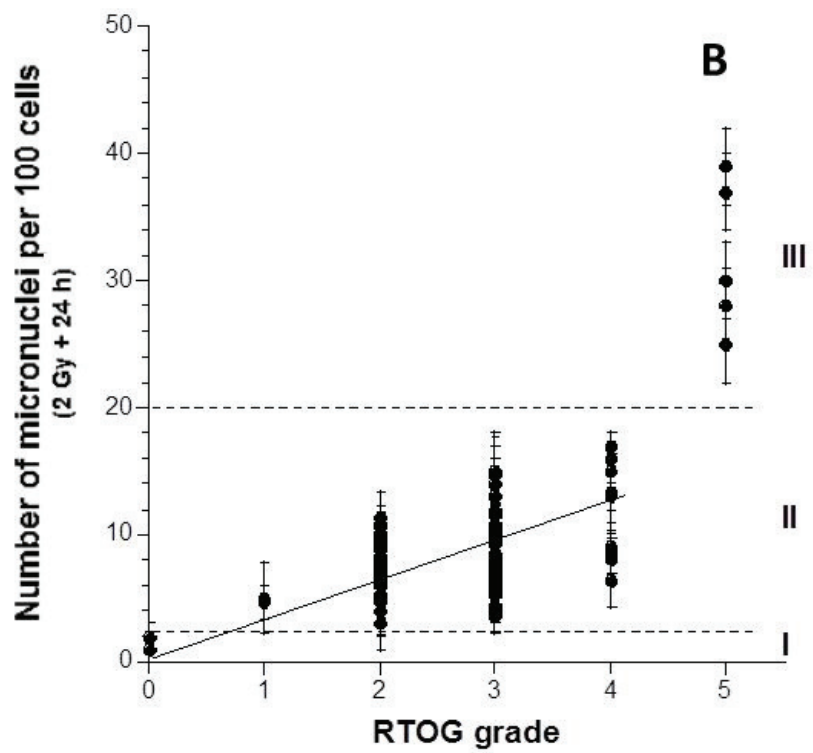
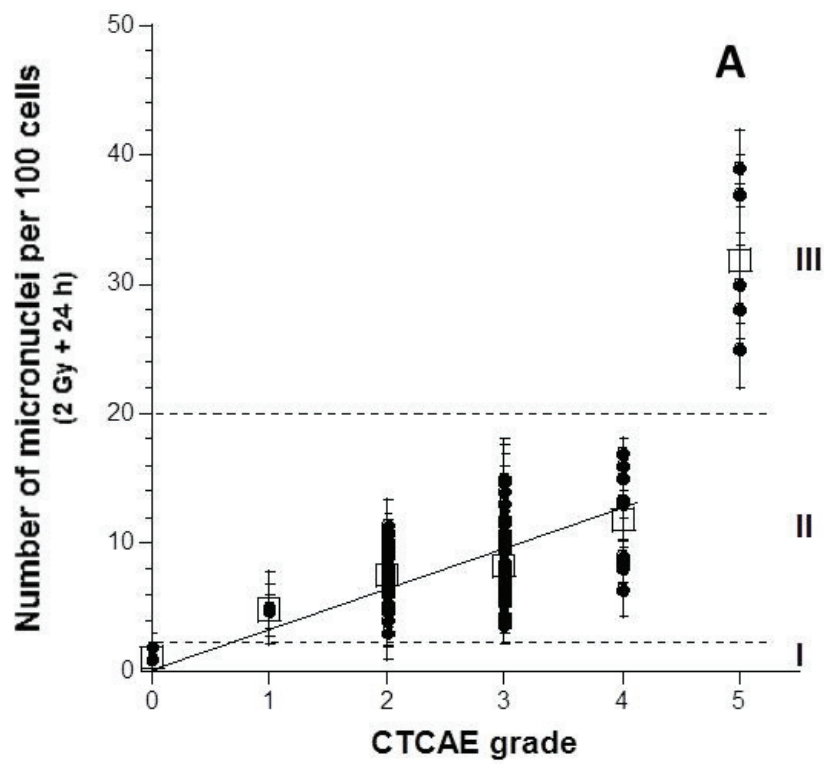


Fig. 2

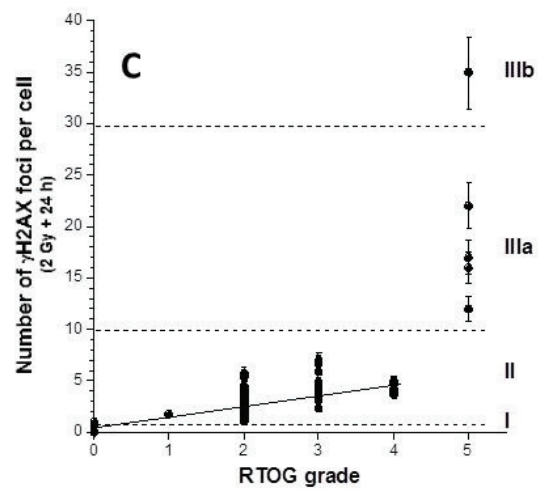
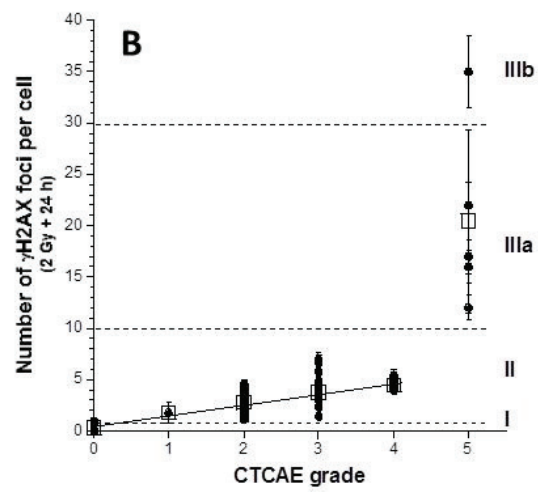
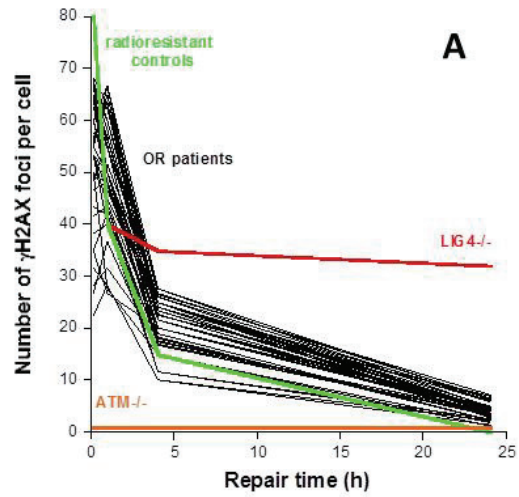


Fig. 3

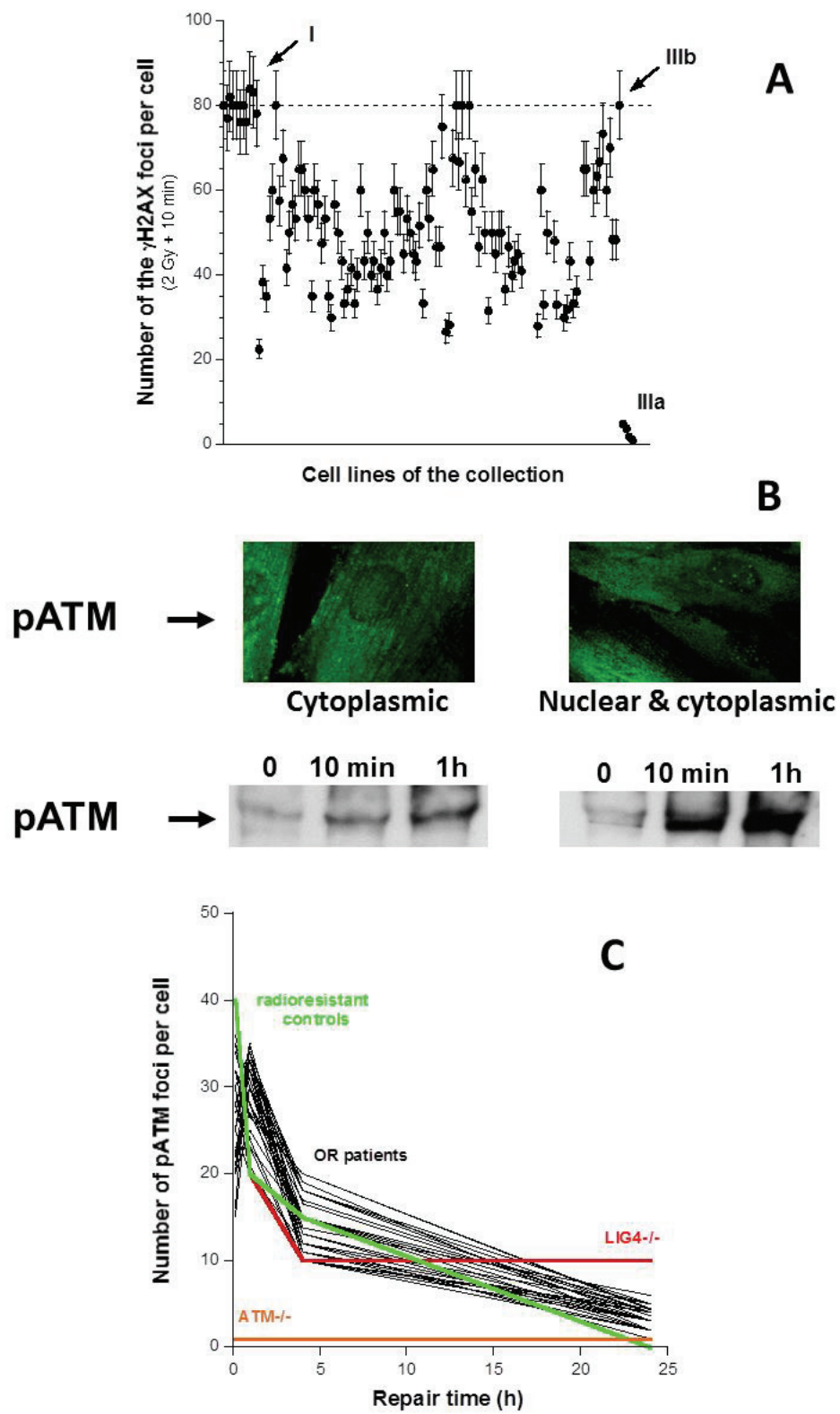


Fig. 4

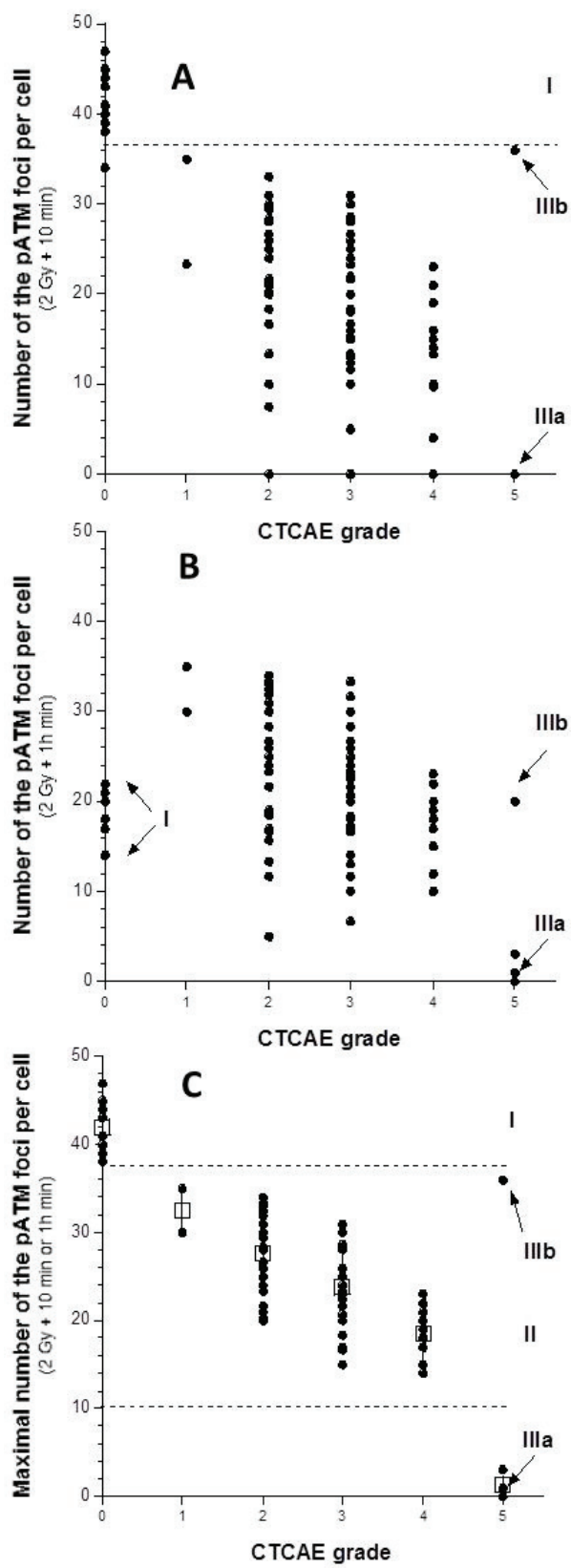


Fig. 5

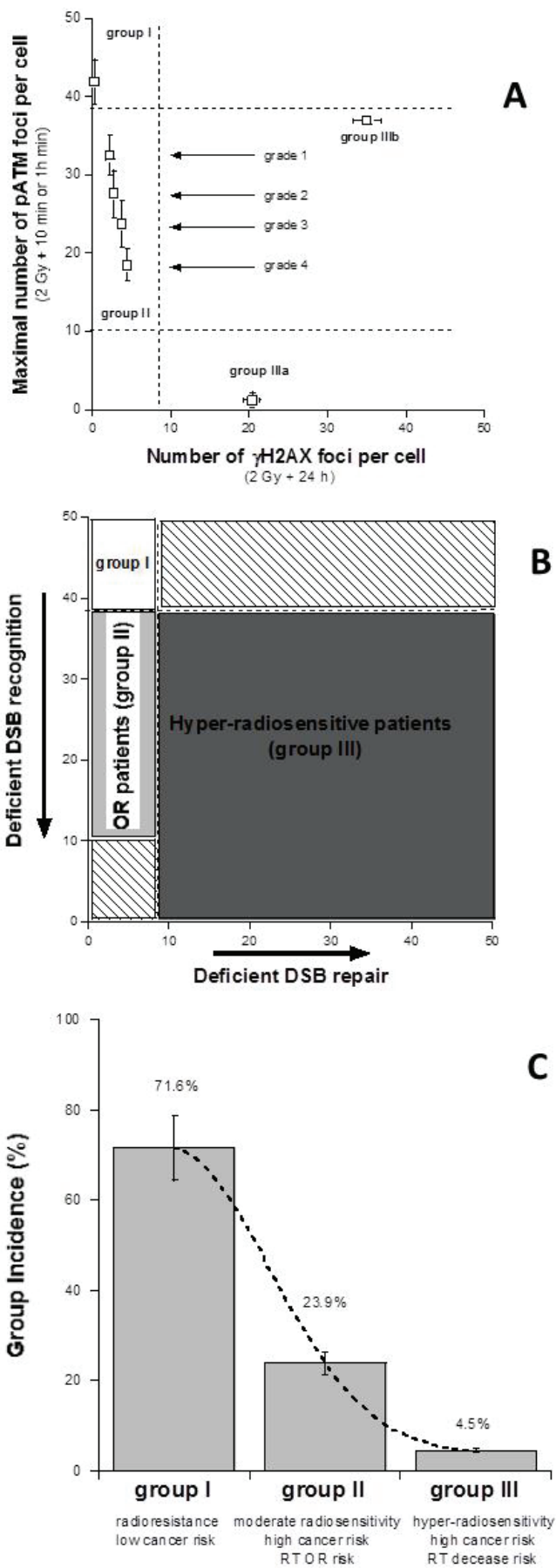
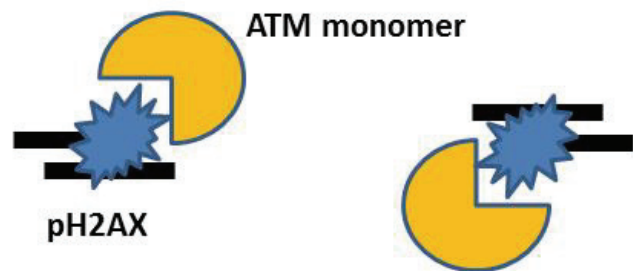


Fig.6

Step 1: DSB induction



Step 2: phosphorylation of H2AX by ATM monomer :
Formation of pH2AX foci



Step 3: DSB repair. ATM redimerization
And transphosphorylation :
Formation of pATM foci

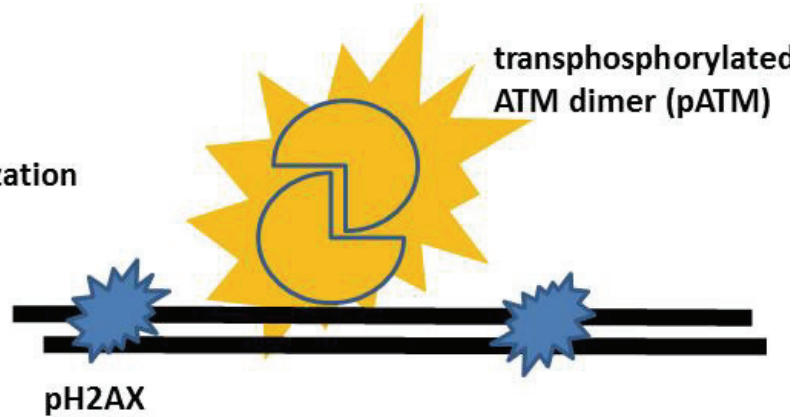


Fig.7

Discussion & perspectives

1. Programme ULICE

1.1. Pertinence des concepts et outils développés

ULICE a trouvé sa justification dans la nécessité impérieuse de fédérer les centres européens de carbone thérapie pour permettre une dissémination plus efficace basée sur une validation scientifique des indications. En effet, selon les rapports des principales agences d'évaluation, il n'existe pas actuellement assez de données disponibles, en particulier d'études comparatives randomisées, pour juger de l'efficacité-sécurité de l'hadronthérapie selon les critères usuellement admis en évaluation médicale. Cette exigence est actuellement incontournable et les centres européens de carbone thérapie vont devoir s'y plier. Des études sont en cours et ULICE se doit d'en faciliter le développement. Par ailleurs, lorsqu'il s'agira de comparer différentes stratégies, ce type d'étude sera nécessaire. Néanmoins il est utile de signaler que la question de la pertinence des études randomisées de phase III, inspirées de la pharmacologie, est soulevée de manière répétée par les experts depuis plusieurs années tant la méthode se prête mal à la RT et aux progrès technologiques qui apportent essentiellement des niveaux d'optimisation successifs d'un principe thérapeutique qui reste toujours le même, mais aussi pour des raisons de durée de suivi nécessaire et d'éthique (411).

Les progrès technologiques en RT sont pratiquement tous fondés sur la poursuite d'un même objectif physique, mesurable, qui est la minimisation de la dose aux tissus sains et la maximisation de la dose au tissu tumoral dans un contexte d'assurance qualité toujours plus exigeant. Aucun principe thérapeutique original n'est mis en jeu, l'ensemble des rayonnements utilisés agissant selon les mêmes effets physiques/biologiques, à la qualité de radiation près. Seul change pour les techniques évaluées le niveau de performance et de qualité vis-à-vis d'aspects opérationnels et mesurables (distribution de dose, précision du repositionnement,

etc). De plus aucune toxicité inconnue ou nouvelle, dans la zone traitée ou à distance, ne peut survenir, comme peut le faire toute nouvelle molécule – sous réserve de respecter les règles de bonne pratique. Les progrès techniques évoluent continuellement depuis des décennies et se succèdent. Aussi l'évaluation d'une technique par des essais de phase III n'aboutirait en général à sa validation qu'après sa propre disparition déjà remplacée par d'autres.

L'objectif principal qui est privilégié par les acteurs institutionnels à travers les études de phase III vise à démontrer un bénéfice en matière de durée de survie. Cet objectif est influencé par de nombreux paramètres qui représentent autant de facteurs de confusion minimisant ou masquant le bénéfice par nature local de la RT, et majorant l'effectif de patients à recruter. Ces études requièrent un nombre important de sujets qui sont suivis sur plusieurs années avec une maturation longue des résultats avant d'observer l'impact local du traitement. Ainsi l'impact en survie de la RT dans le cancer du sein apparaît à plus de dix ans; ce traitement est pourtant indispensable dans le traitement conservateur du sein. Le même problème se pose d'ailleurs pour les nouveaux médicaments qui apparaissent à un rythme supérieur aux capacités de validation par l'étude de la survie. Ceci incite les investigateurs à définir des critères substitutifs (*surrogate criteria*) telle que, par exemple, la réponse précoce en imagerie métabolique. En RT de tels critères peuvent être mesurés de manière précise et reproductible : le calcul et la modélisation de la distribution de dose.

L'approche de phase III soulève aussi des problèmes éthiques et réglementaires issus du principe de précaution en matière de radioprotection (428) qui est très restrictif en France. En effet, la loi oblige le radiothérapeute à mettre en œuvre les moyens adaptés pour minimiser le plus possible la dose aux tissus sains. A partir du moment où des mesures directes et fiables de cette dose existent, il est inconcevable d'en tester le résultat sur des critères indirects à long terme en demandant à la moitié des patients de recevoir une dose supérieure à celle que l'on pourrait techniquement leur délivrer. Les tentatives qui ont été faites de tels essais ont souvent avorté faute d'un nombre suffisant de patients volontaires.

Ces éléments font conclure la SFRO que l'essai randomisé de phase III ne peut être la seule méthode d'évaluation des progrès thérapeutiques en cancérologie et notamment en RT. D'autres méthodes doivent être développées et promues

corrélées aux objectifs poursuivis tels que la qualité de vie, la tolérance des traitements ou leur efficacité économique (428).

1.2. Succès du programme

ENLIGHT et ULICE ont permis de faire émerger à l'échelle de l'Europe une collectivité scientifique et médicale impliquée dans la carbone thérapie, de lui permettre de se connaître et se reconnaître et enfin de structurer la recherche européenne en hadronthérapie en partenariat avec les groupes de recherche transversaux en oncologie-RT (EORTC, ESTRO). Les WP auxquels nous avons participé ont abouti à la rédaction puis à la dissémination de procédures standardisées qui sont appelées à être utilisées par les centres actifs.

1.2.1. WP2

Quatre années de discussion dans le cadre du WP2 ont permis d'isoler certains concepts de doses/volumes spécifiques à l'hadronthérapie, généralement peu décrits dans les publications, et pouvant donner lieu à des écarts notables de pratique. Un consensus fort devait être trouvé sur ces concepts afin d'harmoniser les pratiques de prescription et de réalisation des traitements. Résumons deux exemples pratiques.

- Avec les techniques de RT conventionnelles utilisant des faisceaux de photons et d'électrons, il est tenu compte des incertitudes de repositionnement et de mouvement des organes. Les incertitudes sont sommées et une marge isotrope est ajoutée autour des volumes cibles. Du fait de la courbe de rendement en profondeur des faisceaux d'ions accélérés, il n'est pas logique d'appliquer ces marges géométriques isotropes pour l'ensemble des marges du volume cible. Toute déviation géométrique et/ou changement de densité tissulaire par rapport à la planification peut avoir des conséquences cliniques importantes du fait de la sur efficacité biologique dans la zone du pic de Bragg, pouvant aboutir à un sous dosage de la tumeur et un surdosage des tissus sains inutilement irradiés. Lorsque plusieurs faisceaux sont combinés, il devient délicat de délimiter un PTV unique en combinant l'ensemble des incertitudes géométriques de chaque faisceau comme l'avait déjà soulevé le rapport ICRU 78. Un PTV devrait être individualisé pour chaque faisceau

(techniques passives) ou pour chaque position possible de la cible durant l'irradiation (techniques actives). Il serait idéal de simuler l'ensemble des modifications géométriques possibles et de vérifier la robustesse du plan a priori afin de garantir une irradiation optimale de la cible. Les mêmes principes s'appliquent aux PRV (Planning Risk Volume) pour les organes à risque.

- La seconde illustration concerne les concepts de dose biologique efficace. La même dose absorbée peut avoir des effets biologiques très différents selon les conditions dans lesquelles elle est délivrée. Il n'est donc pas suffisant de rapporter seulement la dose physique. La dose absorbée doit donc être transformée en dose biologique efficace tout en rapportant l'ensemble des variables intervenant dans cette fonction qu'elles soient liées au système expérimental, à l'effet biologique testé, ou aux paramètres inhérents au traitement (dose/fraction, débit, qualité de radiation, étalement...) Lorsque deux techniques sont comparées, la dose iso efficace est définie comme la dose absorbée qui, dans les conditions testées, produit la même probabilité d'effet biologique que dans les conditions de référence (traitement par photons en fractionnement classique). L'ensemble des paramètres que nous venons d'énoncer devra impérativement être scrupuleusement reproduits dans l'ensemble des centres participant à une étude collaborative. La principale difficulté peut venir des différences de TPS dont peuvent être équipés les centres participants. Chaque TPS fait appel à une modélisation particulière de l'EBR qui n'est elle-même qu'une donnée partielle dans l'équation de transformation de la dose. Ensuite, l'EBR est hétérogène au sein de la tumeur puisqu'étant liée au TEL des particules du faisceau. En effet la couverture de l'épaisseur de la tumeur nécessite une modulation de l'énergie et donc du TEL des particules incidentes. La fragmentation des ions apporte un élément de complexité supplémentaire. Le facteur temps a potentiellement un impact aussi important que l'EBR dans l'effet biologique mesuré; en effet le recours à l'hypofractionnement, et donc à des traitements fortement accélérés, est une des caractéristiques princeps de la carbone thérapie. Nous avons recommandé de collecter les données descriptives du traitement les plus brutes en amont de toute modélisation. La distribution du nombre, de l'énergie et du spectre de TEL dans chaque voxel du volume cible pourrait permettre à terme de recalculer l'effet biologique modélisé de toute irradiation quelque soit le TPS utilisé.

Tout mouvement peut avoir des conséquences dosimétriques, biologiques et cliniques non négligeables. Toutefois, l'état des connaissances actuelles en photon

thérapie ne nous a pas permis de dégager des recommandations sur la prise en compte de l'impact du mouvement des organes en hadronthérapie par ions carbone. Des expérimentations radiobiologiques complémentaires apparaissent nécessaires.

Des tentatives d'harmonisation des concepts dose/volume ont été réalisées par le passé. Nous avons eu l'honneur de compter le Pr André Wambersie, Président Honoraire de l'ICRU, dans notre groupe de travail. Les recommandations concernant les concepts de dose/volume utilisés en pratique courante émanent des rapports successifs de cette instance internationale. Elles furent publiées : en 1993 (#50) et 1999 (#62) pour la RT conformationnelle utilisant des faisceaux de photons, en 2004 pour les champs d'électrons (#71), en 2010 pour la RCMI (#83) et en 2007 pour la proton thérapie (#78). Des travaux sont en cours depuis plusieurs années sur la problématique de l'hadronthérapie par ions carbone, sans qu'il n'émerge de recommandation consensuelle. En 2006, l'AIEA et l'ICRU ont édité un rapport commun sur la spécification de la dose en hadronthérapie suite à un workshop ayant eu lieu en 2004, essentiellement autour de l'EBR. A ce moment-là, il est utile de rappeler que seules deux équipes traitaient des patients (NIRS et GSI) et leurs pratiques différaient profondément ce qui a probablement grevé les chances d'obtention d'un consensus. Les deux équipes ont exposé leur méthode de prescription de la dose : dérivée de l'expérience des neutrons sur cellules tumorales de glande salivaire pour les premiers, et modélisées selon le LEM pour les seconds. Aucune procédure commune n'a été entrevue. Les volumes étaient définis selon les recommandations ICRU appliquées en photon thérapie pour les deux équipes (429).

Fort de données micro dosimétriques, radiobiologiques et cliniques plus récentes d'une part, et de l'implication de praticiens ayant un retour d'expérience en hadronthérapie par ions carbone, notre démarche d'harmonisation a certainement été plus complète que les tentatives précédentes. Il est toutefois difficile de prédire si les recommandations que nous avons formulées seront suivies en pratique suite à la cessation du programme ULICE.

Pour conclure sur cette partie, mentionnons une des principales difficultés auxquelles se confronteront les études multicentriques : la divergence des modèles. A côté des trois principaux, d'autres modèles développés plus récemment, notamment à Lyon,

et reflétant plus fidèlement les domaines micro et nano dosimétriques pourraient également être appliqués à l'hadronthérapie par ions carbone. Au vu des lacunes rencontrées dans les hypothèses de chaque modèle, il ne semble pas acceptable d'en imposer un en l'état actuel des connaissances. Alternativement, il apparaît urgent de convaincre les entreprises qui développent les TPS de permettre un accès communautaire à une information suffisante sur les plans de traitement dans un contexte d'évaluation scientifique rigoureuse, et d'autre part d'autoriser l'implémentation de modèles biophysiques innovants.

Tous les modèles ont besoin d'être éprouvés au moyen de données biologiques mesurées non seulement afin d'évaluer leurs prévisions, mais également pour les alimenter. **Les données d'EBR pour les tissus sains apparaissent nettement insuffisantes. La plupart des résultats publiés sont issus du modèle des réactions cutanées de la souris (430).**

1.2.2. WP7

CancerGrid est un consortium de chercheurs britanniques formés au développement des normes ouvertes en cancérologie. Il développe un réseau bioinformatique afin de générer les inclusions de patients, leur randomisation, leur suivi ainsi que des méthodes pour stocker puis analyser des ensembles de données complexes, y compris l'histologie, l'imagerie, les marqueurs moléculaires et génétiques, les marqueurs pronostiques et prédictifs, les réponses à la chimiothérapie et à la RT et les évènements oncologiques.

La méthodologie de l'équipe d'Oxford pour échanger des métadonnées interopérables semblait au départ hermétique et nécessita un effort de compréhension et d'appropriation substantiel. Cette méthodologie a déjà été appliquée avec succès dans deux réalisations majeures touchant la recherche contre le cancer (caBIG et CancerGrid) (431). Après de nombreuses discussions et un séjour à Oxford, nous sommes parvenus à extraire les données sémantiques de notre essai thérapeutique portant sur les carcinomes adénoïdes kystiques et les sarcomes puis à constituer un ensemble de métadonnées génériques pour tout protocole d'hadronthérapie. Le respect de la méthodologie décrite dans le WP7 devrait permettre de réaliser de puissantes méta analyses avec des données comparables à condition que l'ensemble des centres qui vont échanger les

métadonnées observent les procédures précédemment développées dans le WP2 notamment. Il sera également nécessaire de toujours veiller à l'exhaustivité des données recueillies dans les essais d'hadronthérapie par cette méthode, condition sine qua non pour que ce puissant outil bioinformatique tienne ses promesses.

1.2.3. WP10

Nous avons soulevé à plusieurs reprises les conséquences dosimétriques, biologiques et cliniques non négligeables que peuvent avoir les mouvements. Il apparut nécessaire de passer en revue les pratiques d'immobilisation des patients dans les centres existants ou planifiés. La plupart des centres sollicités ont répondu favorablement au questionnaire que nous avons rédigé. Ce questionnaire avait pour objectif d'évaluer les pratiques, leur adaptation à la population pédiatrique (le cas échéant), le degré de précision, l'efficacité économique et environnementale. Il a permis de constater la multiplicité des pratiques comme reflet de l'ingéniosité des équipes mais potentiel frein à toute comparaison des résultats. Nous l'avons rédigé en 2011, étant alors assistant des hôpitaux, ce qui, malgré la revue de la littérature réalisée peut refléter une expérience limitée. L'ensemble des dispositifs d'immobilisation commercialisés était mentionné. Néanmoins aucune requête de modification n'a été formulée. Les questionnaires ont été ensuite analysés, à l'origine de recommandations de standardisation selon la région anatomique concernée. Il s'agit à notre connaissance de la seule contribution de ce type dans la littérature. Les mêmes limites d'applicabilité peuvent toutefois être soulevées.

1.2.4. WP11

Notre participation au WP11 a essentiellement concerné la traduction et la refonte du protocole de notre essai thérapeutique portant sur les carcinomes adénoïdes kystiques et les sarcomes. L'harmonisation puis la sélection des essais cliniques collaboratifs pertinents par le comité scientifique centralisé peut alourdir davantage la complexité de développement des essais de phase III. En effet le galop d'essai fourni par notre essai a conduit à la retouche du projet à la lumière des concepts présentés dans le WP2.1 et selon la trame fournie par le WP2.2. Par ailleurs des démarches

réglementaires dans chaque pays où sera ouvert l'essai doivent être entreprises. Bien que les réglementations de recherche clinique soient déjà harmonisées via des directives européennes, une simplification administrative serait la bienvenue.

1.3. Perspectives générales

Pour optimiser davantage les performances thérapeutiques de la carbone thérapie, de nombreux progrès restent à accomplir notamment en radiobiologie : modélisation de la dose biologique ; compréhension de la réponse tumorale et tissulaire ; adaptation au métabolisme et à l'évolution de la taille tumorale ouvrant la perspective d'une personnalisation du traitement ; marqueurs prédictifs de réponse tumorale et tissulaire, modélisation des irradiations pluri particulaires et de la radio sensibilisation par diverses molécules, prise en compte du facteur individuel.

Il apparait crucial dans notre thématique de recueillir davantage de données sur l'EBR des tissus sains soumis à une irradiation par ions carbone chez l'homme ainsi que leurs valeurs du rapport α/β . L'amélioration des connaissances radiobiologiques requiert davantage de temps de faisceau. Toutefois il est naturel que les centres cliniques, qui n'utilisent généralement que des faisceaux d'ions carbone et de protons, priorisent le temps de faisceau pour le traitement des patients. De nouvelles stratégies sont mises en place pour permettre la réalisation des expérimentations pré cliniques indispensables avec la gamme d'espèces ioniques et d'énergies requises. Dans ce but, il a récemment été proposé de mettre à niveau l'anneau d'ions de basse énergie (*Low Energy Ion Ring* - LEIR) du CERN (432).

La France dispose d'une assise scientifique d'envergure internationale impliquée de longue date dans la thématique comme l'illustre la bibliographie. Les équipes françaises se distinguent notamment dans les domaines de la technologie des accélérateurs, la physique nucléaire, l'imagerie, la modélisation, la recherche clinique, la radiobiologie (tumeurs et tissus sains) et l'instrumentation. Toutefois, malgré ce rationnel fort, aucun centre de traitement n'est encore en construction. En 2012, l'infrastructure **France HADRON**, résultant de la mise en commun des compétences médico-scientifiques a obtenu le label *Investissement d'Avenir* et le

soutien des instances de recherche nationales. Un WP3 radiobiologique prévoit ainsi des travaux de caractérisation des effets des particules sur les tissus sains.

Une partie du budget est consacrée à l'adaptation d'une ligne de faisceau au GANIL pour la recherche préclinique. Un axe de recherche privilégié franco-italien se dessine à travers notamment le premier essai clinique international de phase III en carbone thérapie que nous avons évoqué plus tôt.

Alors que les USA ont été les tout premiers à développer l'hadronthérapie à Berkeley dans un centre de recherche en physique des particules dans les années 80 et 90, leur programme médical dut s'arrêter suite à des coupes budgétaires du département d'état à l'énergie en 1991. Face aux résultats obtenus au Japon et en Europe, au leadership des scientifiques et des industriels étrangers, et également à l'organisation de collaborations médico-scientifiques transnationales, le *National Cancer Institute* a lancé le 28 janvier 2013 un appel à projets très similaire aux infrastructures nationales ou aux Labex soutenus par le plan d'investissements d'avenir en France, pour encourager et cofinancer un centre multidisciplinaire de recherche en carbone thérapie en lien avec un centre clinique de carbone thérapie à financer par ailleurs. En mai 2013, le premier symposium NIRS-Mayo Clinic eut lieu, et d'autres ont suivi depuis notamment à l'initiative de l'université du Colorado.

2. Recherche de nouveaux biomarqueurs de radiosensibilité individuelle

2.1. Justification méthodologique

2.1.1. Technique

La technique d'immunofluorescence permet aujourd'hui d'identifier au sein même des noyaux cellulaires les CDB prises en charge par les différentes voies de réparation et de signalisation sous la forme de foci nucléaires (comme c'est le cas

pour les biomarqueurs pH2AX, MRE11, pATM, 53BP1, etc...) (234). Il existe en particulier une très forte corrélation, toujours valable dans le temps, entre le nombre de CDB non réparées et le nombre de foci pH2AX, spécifique de cette lésion complexe. Cette technique, appliquée à une cohorte adaptée, apparaît donc adaptée pour définir la réponse aux radiations à des doses d'intérêt sociétal puisqu'une CDB par cellule peut correspondre à des doses de l'ordre du mGy (244).

Une étude récemment publiée a objectivé que bien que l'inhibition pharmaceutique d'ATM et DNA-PK affecte l'induction de l'apoptose et la réparation des CDB, aucune association n'a été observée entre le niveau d'apoptose lymphocytaire la radiosensibilité des patients contrairement à ce qui est observé pour la réparation des CDB (433).

L'analyse en immunofluorescence permet l'analyse simultanée de la réparation, de la signalisation et des micronoyaux, permettant un contrôle interne.

L'analyse en IFI peut également être réalisée à haut débit de manière automatisée grâce un microscope *ad hoc* dont le laboratoire s'équiperait prochainement.

Toutefois nous pouvons reprocher aux tests de fonctionnalité de la réponse cellulaire aux dommages radio induits de l'ADN de ne pas prendre en compte l'ensemble des acteurs œuvrant dans la physiopathologie des effets tardifs et de ne considérer que la mort cellulaire, contrairement aux approches pangénomiques/protéomiques.

2.1.2. Modèle cellulaire

La majorité des expériences sur l'expression ou la mutation des gènes a été effectuée sur des lymphocytes (sang frais ou cellules transformées). Pourtant, les réactions tissulaires radio induites concernent plus particulièrement les tissus conjonctifs, l'épithélium ou l'endothélium. Ainsi, même si le choix des lymphocytes reste principalement basé sur des considérations pratiques (simplicité du prélèvement; pas d'étape de culture), il suggère néanmoins plusieurs remarques importantes :

- l'existence de corrélation entre les effets in vitro mesurés sur le sang et la prédiction de réactions cliniques survenant sur d'autres tissus bien différents reste encore à vérifier ;
- l'apoptose, plus fréquente dans les cellules sanguines que dans les autres tissus pourrait constituer un biais technique dans la mise au point des tests prédictifs de la radiosensibilité
- la taille des noyaux de lymphocytes est environ 1,5 fois plus petite que celles des noyaux cellulaires des autres tissus, suggérant l'organisation d'une chromatine plus condensée qui pourrait également constituer un biais technique dans la prédiction de la radiosensibilité ;
- la manipulation des lymphocytes est délicate (faible espérance de vie en culture in vitro) et peut nécessiter alors une transformation par le virus d'Epstein-Barr qui modifie la radiosensibilité comme ce fut démontré pour les fibroblastes (434). Ces mêmes lymphocytes ne peuvent être archivés.

En utilisant les tests clonogéniques, il ne semble pas exister de corrélation entre la radiosensibilité de fibroblastes et de lymphocytes issus d'un même donneur (435, 436).

Les fibroblastes discriminent les patients en fonction de leur radiosensibilité alors que les lymphocytes ne le permettraient pas (437).

La peau est un tissu très accessible et les fibroblastes issus du derme sont aisément cultivables. Ils constituent également un bon modèle des tissus conjonctifs dans lesquelles certaines manifestations majeures de la radiosensibilité s'expriment au niveau clinique. Le fibroblaste est en effet au centre de la physiopathologie de la fibrose radio induite conduisant aux toxicités tardives. C'est sur la peau que les premières observations radio pathologiques ont été étudiées (150). Ceci a conduit de nombreux laboratoires à établir des lignées de fibroblastes de patients radiosensibles. Ainsi, l'établissement du gradient de radiosensibilité pour les syndromes humains a été essentiellement fondé sur la comparaison des lignées fibroblastiques (438).

2.1.3. Dose d'irradiation

Notre méthodologie nous conduit à appliquer les doses de référence en radiobiologie (2 Gy, correspondant à une séance de RT). Nous savons en outre que la courbe dose effet avec notre test et notre objectif biologique suit une relation mathématique simple linéaire pour une gamme de dose très étendue. Notons enfin que l'étalon standard de l'évaluation biologique de la radiosensibilité reste la SF2.

2.1.4. Echelle de temps

La caractérisation de la réponse moléculaire à l'irradiation doit être mesurée dans les minutes ou les heures qui suivent l'irradiation selon l'effet biologique et le point de temps étudiés. Notre pratique nous conduit à réaliser une cinétique des marqueurs de réparation de l'ADN depuis les premières minutes jusque 24h post irradiation. Il s'agit là d'un point majeur reproché à l'équipe d'Azria et al. qui étudie l'apoptose radio induite 48h après l'irradiation des lymphocytes, qui conjugué avec la dose d'irradiation, conduit à une interprétation erronée des résultats (281).

2.1.5. Modèle expérimental

Les modèles moléculaires actuels de la réparation des CDB ont été établis après les travaux réalisés chez les levures, bactéries ou rongeurs, modèles chez lesquels la prolifération cellulaire est bien plus intense que celle des tissus sains humains.

Comme nous l'avons vu précédemment, la recombinaison homologue est le mode de réparation des CDB prépondérant chez les bactéries et les levures, et les souches mutées pour RAD51 et RAD52 expriment logiquement une très forte radiosensibilité. Chez l'homme, les mutations de RAD51 et RAD52 sont létales à l'état embryonnaire. De même, les lignées cellulaires dérivées de rongeurs et mutées pour Ku ou DNA-PKcs sont les plus radiosensibles, mais aucun syndrome humain n'a, à ce jour, été associé à de telles mutations. On peut donc créer des mutants de gènes qui confèrent une hyper radiosensibilité.

Une meilleure prise en compte du facteur individuel passe par une approche qui se focalise délibérément sur l'homme, en utilisant des cellules humaines

aussi peu transformées que possible et les plus représentatives des risques tissulaires.

2.2. Pertinence du modèle fondé sur la transit cyto-nucléaire d'ATM

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

- **Plus que les foci pDNA-PK, les foci pATM sont très informatifs et suggèrent un transit cyto-nucléaire de la protéine après irradiation. Cette hypothèse est notamment renforcée par l'effet du traitement statines + biphosphonates qui semble accélérer le transit d'ATM (424, 439).**
- **Les critères de sélection pour les groupes I, II et III définis précédemment apparaissent comme valables pour les cellules des patients de la cohorte COPERNIC.**

Ainsi, les données CELLINE et COPERNIC ont pu être fusionnées dans un ensemble cohérent. Toutefois, nous avons dû proposer un modèle impliquant ATM pour mieux traduire l'importance de son transit. **Dans notre modèle, les CDB sont prises en charge par le mode majoritaire de réparation par « suture » dont l'initiation passe par la phosphorylation ATM dépendante de l'histone H2AX (pH2AX). En cas de retard du transit, les CDB sont soit non reconnues donc non réparées par suture soit pourraient être prise en charge par le mode minoritaire de réparation fautive de type recombinatoire dépendant de la nucléase MRE11 et physiologiquement inhibée par le passage d'ATM dans le noyau avec pour conséquence la phosphorylation inhibitrice de MRE11. L'équilibre entre ces deux modes est donc contrôlé par la protéine ATM à travers son transit du cytoplasme vers le noyau puis son activité kinase. Les foci nucléaires pMRE11 indiqueraient alors un arrêt de l'activité nucléasique de MRE11 (259, 440, 441) (Figure 42).**

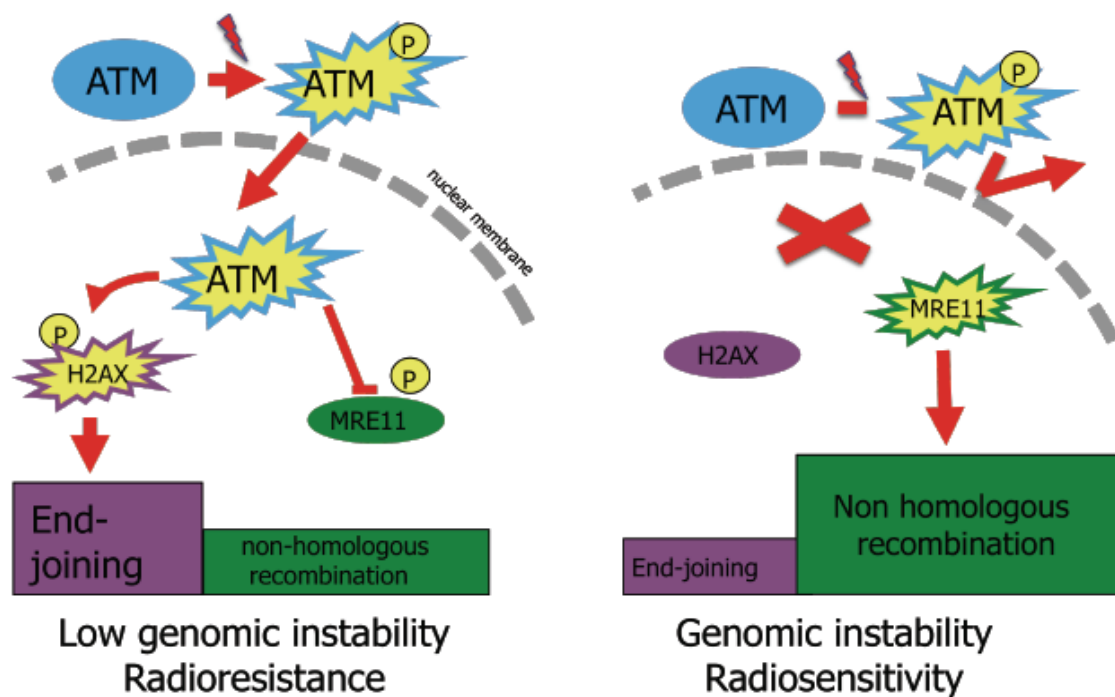


Figure 42 : Modèle actuel de l'équipe d'accueil

Ce modèle expliquerait à la fois la radiosensibilité de syndromes génétiques causés par des mutations de protéines qui ne sont pas impliquées dans la réparation et le phénomène d'hypersensibilité aux faibles doses. Enfin, ce modèle permet de distinguer les effets tissulaires (radiosensibilité) et les effets carcinogènes (prédisposition au cancer radio induit ou radiesthésie). Il sert de support au développement de tests prédictifs de radiosensibilité individuelle innovants.

2.2.1. Un dogme brisé

ATM a longtemps été considérée comme une protéine exclusivement nucléaire.

La fonctionnalité cytoplasmique d'ATM mérite d'être discutée et davantage étudiée, en particulier dans le cadre de notre modèle. Nous avons vu dans l'introduction que ces voies de signalisation sont impliquées dans une partie du phénotype des patients souffrant d'ataxie télangiectasie homozygote.

ATM peut être activée dans le cytoplasme en conditions de stress oxydatif non lié aux radiations, indépendamment de MRN, par exemple en hypoxie. Cette activité

permet d'expliquer les caractéristiques phénotypiques non liées à la réponse cellulaire aux dommages radio induits de l'ADN de l'ataxie télangiectasie (442) (Figure 42).

L'accumulation de radicaux libres oxygénés peut entraîner des dommages de l'ADN, de l'ARN, des lipides et des protéines. Les CSB sont les dommages les plus fréquemment induits le stress oxydatif. La forme oxydée de la protéine est ici un dimère actif solidarisé par des ponts disulfure entre les résidus cystéine 2991 au niveau du domaine FATC (443, 444).

La kinase colocalise dans ce contexte avec les vésicules péroxysomales impliquées dans l'endocytose et les centrosomes (445, 446). Un signal de localisation péroxysomal a d'ailleurs été identifié dans la séquence d'ATM (446). ATM est ici impliquée dans l'induction de l'autophagie via l'activation de TSC2 (445-447). ATM se localise également dans les endosomes où elle interagit avec la β -adaptine impliquée dans l'endocytose médiée par la clathrine (448). Les voies de signalisation activées par les dimères oxydés d'ATM sont multiples : MAPK/ERK (449, 450), PI3K/AKT (451) et IKK-NF- κ B (175). Globalement ces observations remettent en cause le dogme de la localisation primaire nucléaire de la kinase ATM ce qui constituait le postulat de notre travail (Tableau 23). Le tropisme cytosolique d'ATM pourrait résulter soit de l'activation d'un pool cytoplasmique d'ATM distinct du réservoir nucléaire, ou de la translocation d'ATM activé depuis le noyau, de manière similaire à ce qui est observé après irradiation pour activer NF- κ B.

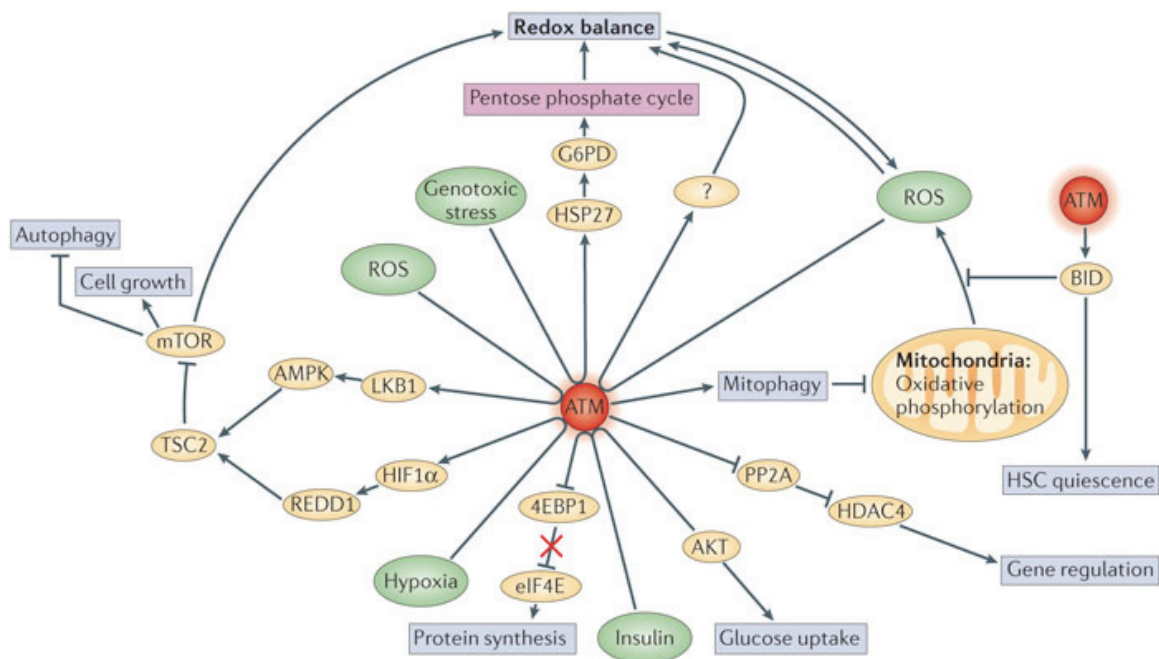


Figure 43 : Substrats cytoplasmiques et voies de signalisation dépendantes d'ATM d'après (452)

	ATM cytoplasmique	ATM nucléaire
Stimulus activateur	espèces réactives de l'oxygène	CDB (radio induites)
Autophosphorylation du résidu Ser-1981	non	oui
Structure de la protéine activée	dimère oxydé	monomère phosphorylé
Voies de signalisation régulées	MAPK/ERK, PI3K/AKT, IKK-NF-κB.	LKB1-AMPK-TSC2-mTORC1
P53-dépendance	non	oui
Voies de mort cellulaire préférentiellement impliquée	autophagie	mort mitotique, apoptose
Références	(443)	(174, 445)

Tableau 23 : Synthèse des voies dans lesquelles ATM intervient selon sa compartimentation

La radiosensibilité individuelle ne serait pas le seul phénotype médié par la variabilité de transit nucléo-cytoplasmique. Une compréhension mécanistique de cette signalisation essentielle au bon fonctionnement cellulaire ainsi que sa pathologie sont décrites ci-après.

2.2.2. Le transit nucléo-cytoplasmique des protéines et son implication en pathologie humaine

2.2.2.1. Description

La synthèse des protéines a lieu dans le cytoplasme, mais les protéines actives dans le noyau (ex : toutes les protéines impliquées dans la réplication et la transcription, la chromatine) doivent au préalable atteindre ce site. Par ailleurs, la transcription se produit dans le noyau et l'ARNm et ses protéines-support doivent rejoindre le cytoplasme en vue d'être traduit. La compartimentation cellulaire est ainsi nécessaire au bon fonctionnement de la cellule. L'enveloppe nucléaire agit comme une barrière séparant ces deux compartiments. Elle est constituée d'une double couche phospholipidique, qui est passivement perméable uniquement aux petites protéines apolaires (<40 kDa). Les autres protéines nécessitent un processus de transport actif unidirectionnel. Le trafic nucléo-cytoplasmique des protéines apparaît ici comme un moyen de régulation des fonctions cellulaires (454). Les échanges entre les deux compartiments se produisent à travers des canaux protéiques complexes incorporés dans la membrane nucléaire et appelés pores nucléaires (455). Ces pores résultent de l'assemblage d'une trentaine de protéines appelées nucléoporines, autour d'un canal central qui a un diamètre limite d'environ 25 à 30 nm (Figure 44).

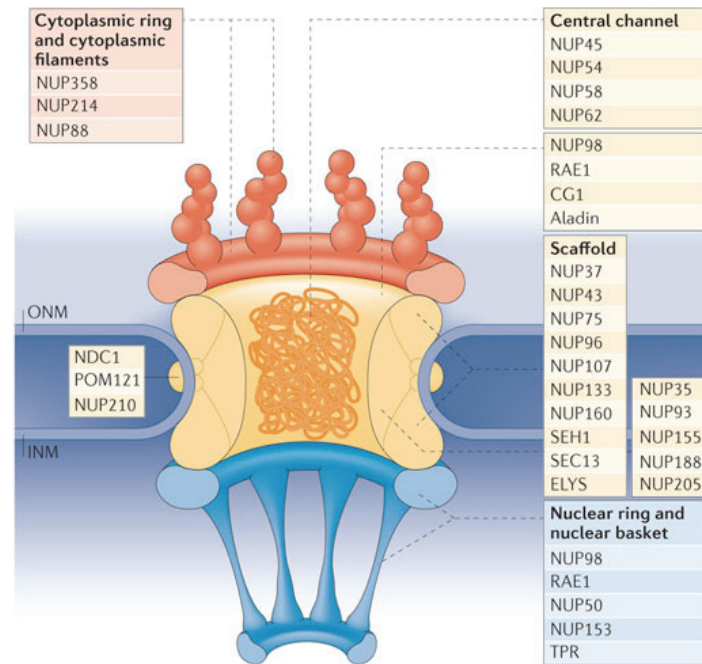


Figure 44 :Structure des pores nucléaires humains, d'après (456)

Les organismes eucaryotes sont équipés d'un grand nombre de voies de transport adaptées aux différentes fonctions des différents tissus (457). La plupart des voies utilisent une superfamille de molécules porteuses flexibles collectivement appelé β -karyophérines. Ces dernières interagissent dans le temps et l'espace pour transloquer au travers des pores nucléaires. Les karyophérines d'importation sont appelés importines et celles d'exportation, exportines (1).

La voie d'importation nucléaire dite classique est la mieux caractérisée (Figure 45). En interphase, les protéines impliquées dans la structure et la fonction du génome sont ciblées vers le noyau grâce aux séquences d'acides aminés spécifiques qu'elles contiennent, appelées signaux de localisation nucléaire (NLS) dont dispose ATM comme nous l'avons vu dans la figure 13. Au cours d'une première étape passive, les protéines qui contiennent un NLS se lient à une importine cytosolique constituée elle-même de deux sous-unités (α et β) qui se lient respectivement au NLS de la protéine cible et aux filaments cytoplasmiques du pore nucléaire. La deuxième étape conduit à la translocation active de la protéine cible via le pore nucléaire. Cette étape nécessite l'hydrolyse du GTP orchestrée par Ran, une petite protéine de liaison au GTP présentant un gradient transnucléaire qui explique l'orientation du transport nucléaire. Contrairement au cytosol, une forte concentration de Ran / GTP est

présente du côté nucléaire. A ce niveau, Ran / GTP se lie à la sous unité β de l'importine, déplaçant l'importine α et libérant ainsi sa protéine cible. Le complexe Ran-GTP/importine β est ensuite réexporté vers le cytosol, où le GTP est hydrolysé en GDP, libérant l'importine β qui peut ensuite participer à un autre cycle

d'importation nucléaire. L'activité de Ran est régulée par une protéine cytosolique activatrice de GTPase, RanGAP1, et par un facteur d'échange nucléotidique lié à la chromatine, RCC1.

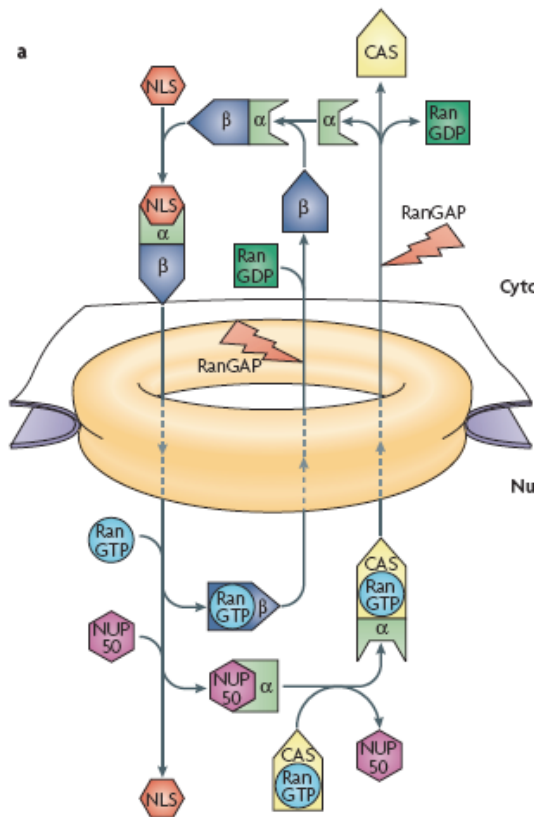


Figure 45 : Schéma de la voie d'importation nucléaire princéps d'après (1)

Les protéines sont ciblées pour l'exportation hors du noyau au moyen de séquences d'acides aminés spécifiques, appelées signaux d'exportation nucléaire (NES). Ces signaux sont reconnus par exportines spécifiques qui escortent les protéines cibles vers le cytoplasme via les pores nucléaires. De manière similaire aux importines β , les exportines se lient à Ran mais, au contraire, elles forment des complexes protéiques stables avec leurs cibles en association avec Ran/GTP dans le noyau.

L'orientation du transport nucléo-cytoplasmique peut être inversé en modifiant le gradient Ran/GTP (458).

Des voies alternes de transport nucléo cytoplasmique existent et ont été détaillées (457).

Des mécanismes distincts impliquant des signaux de localisation spécifiques sont mis en jeu dans le transport des protéines vers les autres organites : mitochondries, peroxyosomes, réticulum endoplasmique...

2.2.2.2. Pathologie du transit nucléo-cytoplasmique

Une compartimentation aberrante est associée à des pathologies aussi diverses que la maladie d'Alzheimer, la lithiase urinaire et le cancer. Peuvent être mis en cause : des mutations dans la séquence des protéines cibles les privant de leur signal de localisation, expression altérée des protéines de transport ou des récepteurs associés, dérégulation de la machinerie de trafic nucléo-cytoplasmique. Ces modifications aboutissent à la perte de fonction de la protéine cible ou à une activation ectopique préjudiciable (Tableaux 24, 25 & 26).

Altérations structurelles ou fonctionnelles des protéines transportées

protéine	maladie	mécanisme	compartimentation	réf
IκB	cancers (sein, ovaire, colon, pancréas, thyroïde), athérosclérose	dérégulation de la phosphorylation d'IκB démasquant le NLS de NF-κB	Activation et localisation nucléaire aberrante de NF-κB	(459)
?	cancers de la prostate, du sein, CHC	?	Activation et localisation nucléaire aberrante de HIF-1α	(460)
PCNA	athérosclérose	Majoration de l'importation des protéines du cycle cellulaire par le LDL oxydé aboutissant à une prolifération	Suractivation nucléaire des protéines du cycle cellulaire	(461)
SRY	syndrome de Swyer	mutation du NLS	perte de localisation nucléaire	(462)
SHOX	dyschondrostéose de Léri-Weill	mutation du NLS	rétenction cytoplasmique	(463)
TRPS1	syndrome trichorhinophalangé	mutation du NLS	perte de localisation nucléaire	(464)
ARX	lissencéphalie liée à l'X	mutation du NLS	perte de localisation nucléaire	(465)
FOXP2	dysphasie congénitale	mutation du NLS	perte de localisation nucléaire	(466)
AIRE	polyendocrinopathie autoimmune-dystrophie ectodermique	mutation du domaine en doigts de zinc	rétenction cytoplasmique	(467)
RPS19	anémie de Blackfan-Diamond	mutation du signal de localisation nucléolaire	perte de localisation nucléolaire	(468)
AGT	hyperoxalurie primitive de type 1	polymorphisme et/ou mutation	localisation mitochondriale aberrante	(469)
hsMOK2	laminopathie (syndrome progéroïde)	mutation de la lamine A/C	agrégation nucléaire aberrante	(470)
SHOC2	syndrome Noonan-like	N-myristoylation acquise	localisation aberrante à la membrane plasmique	(471)
Rhodopsine	rétinite pigmentaire	mutation	rétenction dans le REG	(472)
AVPR2	diabète insipide néphrogénique	mutation	rétenction dans le REG	(473)

ATP7B	maladie de Wilson	mutation	rétention dans le REG	(474)
ABCA1	maladie de Tangier	mutation	perte de localisation membranaire	(475)
Tau	maladies neurodégénératives	hyperphosphorylation	localisation aberrante dans les épines dendritiques	(476)
TARDBP	sclérose latérale amyotrophique	?	localisation aberrante dans le cytoplasme	(477)
FUS	dégénérescence lobaire fronto-temporale	mutation	localisation aberrante dans le cytoplasme	(478)
FOXO	cancers	modifications post traductionnelles	localisation aberrante dans le cytoplasme	(479)
P53	cancers	modifications post traductionnelles, mutations	localisation aberrante dans le cytoplasme	(480)
PTEN	syndrome de Cowden	mutation et défaut d'ubiquitination	séquestration cytoplasmique	(481)

Tableau 24 : pathologies associées à une altération de la structure/fonction des protéines transportées.

Altérations structurelles ou fonctionnelles des protéines de transport

maladie	mécanisme	réf
infertilité	expression aberrante de l'importine $\alpha 1\alpha 2$	(482)
cancer du sein	formes tronquées d'importine α (absence de site de liaison au NLS)	(483)
infection par le virus Ebola	séquestration cytoplasmique de la karyophérine $\alpha 1$ par la protéine EBOV	(484)
cancer du sein, mélanome	surexpression d'importine $\alpha 1$	(485)
stress cellulaire	localisation nucléaire aberrante des importines	(486)
athérosclérose, cancer	dérégulation de l'hydrolyse de Ran-GTP	(487)

Tableau 25 : pathologies associées à une altération structurelle ou fonctionnelle des protéines de transport

Altérations structurelles ou fonctionnelles du pore nucléaire

maladie	mécanisme	réf
grippe	sous-régulation de mNup98	(488)
infection à poliovirus/rhinovirus	dégradation de Nup153	(489)
LAM	sur-régulation du complexe Nup214/Nup88	(490)
cancers	surexpression de Nup88	(491)
cirrhose biliaire primitive	auto-immunisation contre gp210 et p62	(492)
athérosclérose	dérégulation de p62	(493)
fibrose atriale et mort subite	mutation de Nup155	(494)
nécrose striatale bilatérale infantile,	mutation de p62	(495)
syndrome triple A	mutation d'ALADIN	(496)

Tableau 26 : pathologies associées à une altération structurelle ou fonctionnelle du pore nucléaire

Après avoir discuté la pertinence de notre modèle pour expliquer les variations interindividuelles de radiosensibilité, il apparaît utile également de clarifier la pertinence et le potentiel de dissémination du test prédictif qui en est issu.

2.3. Perspectives

2.3.1. *Cognitives*

Larry Bodgi, doctorant dans l'équipe d'accueil, a développé une modélisation mathématique des données d'immunofluorescence recueillies au cours de ces dix dernières années. Une formule décrivant la cinétique d'apparition/disparition des protéines de signalisation et réparation des CDB après irradiation a été proposée (497).

Cette formule permet d'exposer une nouvelle interprétation des paramètres α et β du modèle LQ, modèle empirique décrivant le mieux les courbes de survie et très utilisé en pratique.

Schématiquement le nouveau modèle développé par l'équipe décrit l'induction de CDB par les radiations ionisantes. Il s'ensuit une oxydation d'ATM aboutissant à sa monomérisation. Les monomères actifs d'ATM peuvent se réassocier - et donc devenir inactifs - entre eux ou avec d'autres protéines ou encore diffuser vers le noyau cellulaire. A ce moment, une reconnaissance et éventuellement une réparation des CDB est permise. Parmi les CDB non réparées, certaines participent à la mort cellulaire, d'autres demeurent tolérées par la cellule. Il existe donc deux types de CDB létales non réparables : les CDB de type α , reconnues mais non réparées, et les CDB de type β , (non reconnues et non réparées). (publication soumise)

Ce nouveau modèle permet ainsi d'intégrer l'hypersensibilité aux faibles doses et les pathologies congénitales associées à une hyper radiosensibilité mais non liées à un défaut des protéines de réparation des CDB comme la chorée de Huntington (439). La protéine mutée interagirait avec la kinase ATM et en retarderait le transit vers le noyau.

2.3.2. Recherche clinique appliquée : les 3 principaux projets

2.3.2.1. (PR)EVIRAS (Annexe 3.2)

La radiosensibilité de chaque type cellulaire entrant dans la constitution des OAR est caractérisée par une valeur α/β dont le substratum biologique n'est toujours pas expliqué à ce jour.

Dans une étude récente basée sur une méthodologie proche de la nôtre, la radiosensibilité (mesurée par immunofluorescence de 53BP1) des diverses populations cellulaires présentes dans les 3 strates de peau irradiée in vivo était comparée au sein du même individu et entre les 35 patients de l'étude. Les résultats suggèrent que la variation interindividuelle dans la réparation des CDB est plus prononcée que les variations entre les différents types cellulaires du même individu (498).

La question des variations inter tissulaires des biomarqueurs issus du transit cyto-nucléaire d'ATM n'est pas dénuée d'intérêt dans ce contexte. Le modèle que nous développons semble à même d'expliquer le substratum biologique du modèle LQ sur le plan théorique (497). Une illustration biologique et clinique s'impose. Les variations intra et inter individuelles de biomarqueurs potentiels de radiosensibilité isolés dans le travail de thèse ont été étudiés en fin de période de thèse dans 5 tissus sains chez 5 patientes devant bénéficier de RT postopératoire à l'encontre d'adénocarcinomes mammaires infiltrants (étude de faisabilité PREVIRAS; RCB : 2013-A01100-45, dont les matériels et méthodes ont été développés). Les résultats seront présentés lors de la soutenance.

Fort des premiers résultats concluants, l'étude prospective EVIRAS fera suite à PREVIRAS en vue d'obtenir des corrélations statistiquement significatives avec un nombre de sujets suffisant.

2.3.2.2. ARPEGE (Annexe 3.3)

A partir de 2011, nous avons mis au point l'étude ARPEGE (Analyse de la Radiosensibilité individuelle en oncologie PÉdiatrique dans l'inter région Grand-Est) et constitué un groupe d'investigateurs cliniques (oncopédiatres, radiothérapeutes pédiatriques) dans les villes universitaires du Grand Est de la France.

En effet :

- Chaque année environ 2400 nouveaux cas de cancers de l'enfant (0-14 ans) et l'adolescent (15-19 ans) sont recensés en France, avec un âge moyen au diagnostic de 5 ans (499). Bien que la plupart des protocoles thérapeutiques tentent actuellement de limiter l'emploi de la RT dans cette population, elle reste incontournable pour le traitement curatif des tumeurs cérébrales, lymphomes de Hodgkin, leucémies aiguës, sarcomes d'Ewing et des tissus mous, neuroblastomes, néphroblastomes ou rétinoblastomes de haut risque. Environ 900 enfants et adolescents sont traités par RT chaque année en France (500).
 - La radiosensibilité des tissus sains de l'enfant et de l'adolescent est inconnue à ce jour, avec probablement de grandes variabilités en fonction de l'âge si l'on considère l'ensemble des modifications des fonctions métaboliques tout au long de la croissance. Seuls de très rares cas d'enfants ont été étudiés quant à leur radiosensibilité (501, 502). Actuellement, et du fait de l'absence de test prédictif fiable de la toxicité radique, il n'existe pas, en pratique courante, d'adaptation personnalisée de la dose délivrée et/ou de son étalement/fractionnement.
 - L'espérance de vie pour les 80 % des enfants/adolescents susceptibles de guérir est longue, et l'incidence des complications post radiques précoces et surtout tardives, proportionnelle à la dose délivrée pourrait dépasser celle de l'adulte. Trois à 5% des enfants et adolescents sont susceptibles de développer une toxicité tardive pouvant entraîner des séquelles parfois létales et avec un impact socio-économique majeur (troubles de scolarité, mobilisation des parents, mésinsertion professionnelle, hospitalisations et traitements symptomatiques coûteux, paupérisation...)
- Pour toutes ces raisons, la prise en compte du facteur individuel aura donc un impact majeur dans le traitement par RT des cancers pédiatriques.

Cette étude prospective, dont nous sommes l'investigateur principal, aura pour objectif principal d'évaluer le pouvoir prédictif du test d'immunofluorescence indirecte sur fibroblastes dermiques sur la survenue de toxicités précoces cutanéomuqueuses qualifiées d'inhabituelles chez les enfants et adolescents traités par RT avec ou sans chimiothérapie préalable pour un cancer.

Il s'agira en outre de :

- Mettre en évidence des seuils de prédiction de survenue de toxicités précoces cutanéomuqueuses qualifiées d'inhabituelles à l'aide des résultats du test IFI afin de définir des groupes de radiosensibilité individuelle.
- Comparer les performances du test IFI au test des micronoyaux (MN) réalisé sans surcoût sur les fibroblastes
- Décrire les anomalies moléculaires courantes chez les patients identifiés comme radiosensibles sur le test IFI à l'aide de marqueurs d'IFI complémentaires.
- Étudier la corrélation entre les résultats du test IFI et la survenue de tumeurs secondaires chez les enfants et adolescents traités par RT pour un cancer.
- Étudier la corrélation entre les résultats du test IFI et la survenue de toxicités tardives de grade 3-4 ou de séquelles graves chez les enfants et adolescents traités par RT pour un cancer.
- Étudier la corrélation entre le degré de sévérité d'une toxicité aiguë et l'apparition d'une toxicité tardive ou d'une séquelle grave (incluant les tumeurs secondaires).
- Mettre en évidence des seuils de prédiction de survenue de toxicités tardives de grade 3-4 ou de séquelles graves (incluant les tumeurs secondaires) à l'aide des résultats du test IFI afin de définir des groupes de radiosensibilité individuelle.

Ainsi 157 enfants et adolescents seront inclus et suivis durant 15 ans. Le protocole est joint en annexe 3.4.

ARPEGE a reçu un financement de la Société Française des Cancers de l'Enfant (100 000€), de l'Association de REcherche sur les Maladies Infantiles Graves (50 000€) et du PHRC interrégional (100 000€).

2.3.2.3. INDIRA

Le projet INDIRA financé dans le cadre des Investissements d'Avenir (AAP Radioprotection à hauteur de 2,6 M€) consiste à quantifier la radiosensibilité individuelle dans la population générale. Animée par Nicolas Foray, cette étude propose de mettre au point et de valider des tests rapides capables d'estimer la radiosensibilité individuelle et son impact réel :

- sur une gamme de dose de radiations (de 1 à 2000 mGy) qui comprend des faibles doses concernant les travailleurs de l'industrie nucléaire, les populations en cas d'accident nucléaire mais aussi les doses de référence en radiobiologie;
- sur des prélèvements effectués sur une cohorte de 500 hommes volontaires sains du SAMU qui pourraient être amenés à intervenir dans des conditions d'urgence lors d'accidents nucléaires.
- à partir de prélèvement de sang, de follicules pileux et de peau (fibroblastes et kératinocytes) en testant la rapidité et la fiabilité des tests prédictifs de la radiosensibilité individuelle fondés sur une mesure de la fonctionnalité d'acteurs majeurs de la réparation de l'ADN (marqueurs H2AX, MRE11, ATM, et 53BP1 observés à travers différents tests immunologiques tels que l'immunofluorescence, des puces à anticorps ou des tests ELISA conventionnels avec comme paramètres mesurés le nombre de foci nucléaire ou la quantité globale de protéine phosphorylée.)

Ce projet met en œuvre pendant 4 ans des équipes de l'INSERM (UMR1052 – Lyon), du CEA (LGRK-Evry et LCE-Fontenay) et le SAMU de Paris. Elles collaboreront pour délivrer un dispositif opérationnel de base capable de répondre à une meilleure prise en compte du facteur individuel dans l'évaluation du risque associé aux expositions aux radiations ionisantes.

Conclusion générale

Les concepts fondamentaux développés dans l'équipe d'accueil autour de la nucléarisation d'ATM - et dont l'effet du TEL a été marginalement étudié - peut intéresser la communauté européenne dans la modélisation harmonisée de la dose biologique reçue par les tissus sains, cruciale à l'essor de la technique.

Premièrement, il apparaît en effet possible que le facteur individuel s'exprime différemment dans la genèse des toxicités observées en hadronthérapie. En effet, chez les patients radiosensibles, un surcroît de toxicité est théoriquement à attendre pour les tissus sains exposés à un TEL élevé conjugué à un hypofractionnement. En effet de manière générale, plus la dose reçue par un OAR augmente, plus la probabilité d'observation d'une toxicité sévère augmente quelle que soit la radiation, la technique ou la radiosensibilité individuelle. La part du facteur individuel dans les conséquences cliniques s'en trouve ainsi diluée. Modérons ce propos puisqu'un volume marginal de tissus sains se situe dans la zone du pic de Bragg étalé bien que, pour certains de ces tissus, la tolérance au traitement soit déterminée par la dose maximale ponctuelle.

Deuxièmement, les ratios $\alpha/\beta_{\text{tissus sains}}$ sont certainement à redéfinir dans ce type d'approche à condition d'utiliser des modèles expérimentaux pertinents. Notre nouveau modèle a permis ainsi de relier ces paramètres empiriques extraits des courbes de survie à des paramètres directement liés à l'efficacité du transit cytonucléaire d'ATM. ULICE a abordé la problématique de la modélisation de la dose isoefficace pour les tumeurs dans la livrable DJRA 5.8 mais a globalement délaissé les tissus sains. Il s'agit d'une perspective importante quant à la pertinence des tests de radiosensibilité avant hadronthérapie, mais également des développements technologiques nécessaires pour amoindrir le volume de tissu sain irradié à forte dose iso efficace. Cette démarche a été engagée dans les WP4, 5 et 6 d'ULICE traitant respectivement de la problématique des organes mobiles, de l'hadronthérapie adaptative et des bras iso centrés. Des efforts seront également à fournir afin d'améliorer les modèles prédisant la dose iso efficace qui alimentent les TPS actuels. Ces voies d'amélioration seront explorées dans les différents WP de France-Hadron.

La multiplicité des approches radiobiologiques apportées par les équipes partenaires du programme ULICE, notamment à travers les actions du WP3, ainsi que le réseau constitué peut offrir à la fois une source d'hypothèses nouvelles et des perspectives de collaboration (pré)cliniques intéressantes.

Ainsi malgré l'apparent hiatus séparant la radiosensibilité individuelle et l'implémentation de l'hadronthérapie en Europe, ULICE et la thématique de l'équipe d'accueil se sont ainsi parfaitement complétées pour enrichir les connaissances et concepts se rapportant à la genèse des toxicités en hadronthérapie par ions carbone. Ce travail de thèse bicéphale a permis de générer des hypothèses de recherche transversale et clinique qui pourront être développées dans les années à venir en exploitant les outils et le réseau constitués grâce à ULICE.

Références

1. Stewart M. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(3):195-208.
2. Cucinotta FA, Durante M. Cancer risk from exposure to galactic cosmic rays: implications for space exploration by human beings. *Lancet Oncol.* 2006;7(5):431-5.
3. Frank SA. Genetic predisposition to cancer - insights from population genetics. *Nat Rev Genet.* 2004;5(10):764-72.
4. Bruner DW, Movsas B, Konski A, Roach M, Bondy M, Scarantino C, et al. Outcomes research in cancer clinical trial cooperative groups: the RTOG model. *Qual Life Res.* 2004;13(6):1025-41.
5. Durante M. New challenges in high-energy particle radiobiology. *The British journal of radiology.* 2014;87(1035):20130626.
6. Thoms J, Bristow RG. DNA repair targeting and radiotherapy: a focus on the therapeutic ratio. *Seminars in radiation oncology.* 2010;20(4):217-22.
7. Thames HD, Jr., Withers HR, Peters LJ, Fletcher GH. Changes in early and late radiation responses with altered dose fractionation: implications for dose-survival relationships. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 1982;8(2):219-26.
8. Binder-Foucard F, Belot A, Delafosse P, Remontet L, Woronoff A, Bossard N. Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012. Partie 1 – Tumeurs solides. Saint Maurice ed: Institut de veille sanitaire; 2013. 122 p.
9. Cox JD, Stetz J, Pajak TF. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 1995;31(5):1341-6.
10. Bentzen SM, Overgaard J. Patient-to-Patient Variability in the Expression of Radiation-Induced Normal Tissue Injury. *Seminars in radiation oncology.* 1994;4(2):68-80.
11. Bourne RG, Kearsley JH, Grove WD, Roberts SJ. The relationship between early and late gastrointestinal complications of radiation therapy for carcinoma of the cervix. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 1983;9(10):1445-50.
12. ICRP. ICRP Publication 103: The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. *Ann ICRP.* 2007;37(2-4).
13. Mohanti BK, Bansal M. Late sequelae of radiotherapy in adults. *Support Care Cancer.* 2005;13(10):775-80.
14. Pommier P, Gomez F, Sunyach MP, D'Hombres A, Carrie C, Montbarbon X. Phase III randomized trial of Calendula officinalis compared with trolamine for the prevention of acute dermatitis during irradiation for breast cancer. *J Clin Oncol.* 2004;22(8):1447-53.
15. Tucker SL, Turesson I, Thames HD. Evidence for individual differences in the radiosensitivity of human skin. *Eur J Cancer.* 1992;28A(11):1783-91.
16. Turesson I. Individual variation and dose dependency in the progression rate of skin telangiectasia. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 1990;19(6):1569-74.
17. Baumann M, Holscher T, Begg AC. Towards genetic prediction of radiation responses: ESTRO's GENEPI project. *Radiother Oncol.* 2003;69(2):121-5.
18. Jackson A, Marks LB, Bentzen SM, Eisbruch A, Yorke ED, Ten Haken RK, et al. The lessons of QUANTEC: recommendations for reporting and gathering data on dose-volume dependencies of treatment outcome. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 2010;76(3 Suppl):S155-60.
19. Emami B, Lyman J, Brown A, Coia L, Goitein M, Munzenrider JE, et al. Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 1991;21(1):109-22.
20. Holthusen H. [Development of the concept of dosage in the therapeutic use of ionizing rays]. *Strahlentherapie.* 1950;82(4):487-502.
21. Bergonié A. De la nécessité médico-légale de n'être pas trop affirmatif sur la pseudo-innocuité de certaines doses en radiothérapie. *Archives d'Electricité Médicale.* 1907;15:604.
22. Dorr W. Three A's of repopulation during fractionated irradiation of squamous epithelia: Asymmetry loss, Acceleration of stem-cell divisions and Abortive divisions. *International journal of radiation biology.* 1997;72(6):635-43.
23. Bentzen SM. Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(9):702-13.

24. Dorr W, Hendry JH. Consequential late effects in normal tissues. *Radiother Oncol.* 2001;61(3):223-31.
25. Pinkawa M, Holy R, Piroth MD, Fishedick K, Schaar S, Szekely-Orban D, et al. Consequential late effects after radiotherapy for prostate cancer - a prospective longitudinal quality of life study. *Radiat Oncol.* 2010;5:27.
26. Curie P, Becquerel H. Action physiologique des rayons du radium. *C R Seances Acad Sci III.* 1901;132:1289-91.
27. von Jagic N, Schwarz G., L vS. Blutbefunde bei Roentgenologen. *Berl Klin Wechschr XL.* 1911;XL:1220.
28. Coutard H. The Results and Methods of Treatment of Cancer by Radiation. *Ann Surg.* 1937;106(4):584-98.
29. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014;64(1):9-29.
30. Rubin P. Radiation toxicology: quantitative radiation pathology for predicting effects. *Cancer.* 1977;39(2 Suppl):729-36.
31. Drzymala RE, Mohan R, Brewster L, Chu J, Goitein M, Harms W, et al. Dose-volume histograms. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 1991;21(1):71-8.
32. Burman C, Kutcher GJ, Emami B, Goitein M. Fitting of normal tissue tolerance data to an analytic function. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 1991;21(1):123-35.
33. Withers HR, Taylor JM, Maciejewski B. Treatment volume and tissue tolerance. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 1988;14(4):751-9.
34. Trott KR, Tamou S, Sassy T, Kizsel Z. The effect of irradiated volume on the chronic radiation damage of the rat large bowel. *Strahlenther Onkol.* 1995;171(6):326-31.
35. Kwa SL, Lebesque JV, Theuws JC, Marks LB, Munley MT, Bentel G, et al. Radiation pneumonitis as a function of mean lung dose: an analysis of pooled data of 540 patients. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 1998;42(1):1-9.
36. Kam MK, Leung SF, Zee B, Chau RM, Suen JJ, Mo F, et al. Prospective randomized study of intensity-modulated radiotherapy on salivary gland function in early-stage nasopharyngeal carcinoma patients. *J Clin Oncol.* 2007;25(31):4873-9.
37. Kong FM, Pan C, Eisbruch A, Ten Haken RK. Physical models and simpler dosimetric descriptors of radiation late toxicity. *Seminars in radiation oncology.* 2007;17(2):108-20.
38. Bentzen SM, Constine LS, Deasy JO, Eisbruch A, Jackson A, Marks LB, et al. Quantitative Analyses of Normal Tissue Effects in the Clinic (QUANTEC): an introduction to the scientific issues. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 2010;76(3 Suppl):S3-9.
39. Marks LB, Yorke ED, Jackson A, Ten Haken RK, Constine LS, Eisbruch A, et al. Use of normal tissue complication probability models in the clinic. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 2010;76(3 Suppl):S10-9.
40. Grosclaude P, Remonet L, Belot A, Danzon A, Rasamimanana Cerf N, Bossard N. *Survie des personnes atteintes de cancer en france, 1989-2007. Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim.* Saint-Maurice: Institut de veille sanitaire, 2013.
41. Evans ES, Hahn CA, Kocak Z, Zhou SM, Marks LB. The role of functional imaging in the diagnosis and management of late normal tissue injury. *Seminars in radiation oncology.* 2007;17(2):72-80.
42. Jackson A, Yorke ED, Rosenzweig KE. The atlas of complication incidence: a proposal for a new standard for reporting the results of radiotherapy protocols. *Seminars in radiation oncology.* 2006;16(4):260-8.
43. Mertens AC, Yasui Y, Neglia JP, Potter JD, Nesbit ME, Jr., Ruccione K, et al. Late mortality experience in five-year survivors of childhood and adolescent cancer: the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol.* 2001;19(13):3163-72.
44. Hudson MM, Mertens AC, Yasui Y, Hobbie W, Chen H, Gurney JG, et al. Health status of adult long-term survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Jama.* 2003;290(12):1583-92.
45. Oeffinger KC, Mertens AC, Sklar CA, Kawashima T, Hudson MM, Meadows AT, et al. Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *N Engl J Med.* 2006;355(15):1572-82.
46. Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol.* 2012;14 Suppl 5:v1-49.
47. Turner CD, Rey-Casserly C, Liptak CC, Chordas C. Late effects of therapy for pediatric brain tumor survivors. *J Child Neurol.* 2009;24(11):1455-63.

48. Merchant TE, Kiehna EN, Li C, Shukla H, Sengupta S, Xiong X, et al. Modeling radiation dosimetry to predict cognitive outcomes in pediatric patients with CNS embryonal tumors including medulloblastoma. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2006;65(1):210-21.
49. Zebrack BJ, Gurney JG, Oeffinger K, Whitton J, Packer RJ, Mertens A, et al. Psychological outcomes in long-term survivors of childhood brain cancer: a report from the childhood cancer survivor study. *J Clin Oncol*. 2004;22(6):999-1006.
50. La situation du cancer en France en 2012. INCa, editor. Boulogne-Billancourt 2012.
51. Luengo-Fernandez R, Leal J, Gray A, Sullivan R. Economic burden of cancer across the European Union: a population-based cost analysis. *Lancet Oncol*. 2013;14(12):1165-74.
52. Jaisson-Hot I, Schott AM, Clippe C, Ganne C, Hajri T, Poncet B, et al. [Methodology of economic assessment: example in oncology]. *Bulletin du cancer*. 2003;90(11):939-45.
53. Konski A, Speier W, Hanlon A, Beck JR, Pollack A. Is proton beam therapy cost effective in the treatment of adenocarcinoma of the prostate? *J Clin Oncol*. 2007;25(24):3603-8.
54. Cooperberg MR, Ramakrishna NR, Duff SB, Hughes KE, Sadownik S, Smith JA, et al. Primary treatments for clinically localised prostate cancer: a comprehensive lifetime cost-utility analysis. *BJU Int*. 2013;111(3):437-50.
55. Kupelian PA, Elshaikh M, Reddy CA, Zippe C, Klein EA. Comparison of the efficacy of local therapies for localized prostate cancer in the prostate-specific antigen era: a large single-institution experience with radical prostatectomy and external-beam radiotherapy. *J Clin Oncol*. 2002;20(16):3376-85.
56. Potters L, Klein EA, Kattan MW, Reddy CA, Ciezki JP, Reuther AM, et al. Monotherapy for stage T1-T2 prostate cancer: radical prostatectomy, external beam radiotherapy, or permanent seed implantation. *Radiother Oncol*. 2004;71(1):29-33.
57. Hunter GK, Reddy CA, Klein EA, Kupelian P, Angermeier K, Ulchaker J, et al. Long-term (10-year) gastrointestinal and genitourinary toxicity after treatment with external beam radiotherapy, radical prostatectomy, or brachytherapy for prostate cancer. *Prostate Cancer*. 2012;2012:853487.
58. Sanda MG, Dunn RL, Michalski J, Sandler HM, Northouse L, Hembroff L, et al. Quality of life and satisfaction with outcome among prostate-cancer survivors. *N Engl J Med*. 2008;358(12):1250-61.
59. Hummel SR, Stevenson MD, Simpson EL, Staffurth J. A model of the cost-effectiveness of intensity-modulated radiotherapy in comparison with three-dimensional conformal radiotherapy for the treatment of localised prostate cancer. *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))*. 2012;24(10):e159-67.
60. Zelefsky MJ, Fuks Z, Hunt M, Lee HJ, Lombardi D, Ling CC, et al. High dose radiation delivered by intensity modulated conformal radiotherapy improves the outcome of localized prostate cancer. *J Urol*. 2001;166(3):876-81.
61. Lee CT, Dong L, Ahamad AW, Choi H, Cheung R, Lee AK, et al. Comparison of treatment volumes and techniques in prostate cancer radiation therapy. *Am J Clin Oncol*. 2005;28(6):618-25.
62. Ciezki JP, Reddy CA, Angermeier K, Ulchaker J, Stephans KL, Tendulkar RD, et al., editors. Long-term toxicity and associated cost of initial treatment and subsequent toxicity-related intervention for patients treated with prostatectomy, external beam radiotherapy, or brachytherapy: A SEER/Medicare database study. *Genitourinary Cancers Symposium*; 2012 February 2, 2012.: American Society of Clinical Oncology (ASCO).
63. Hall EJ. Intensity-modulated radiation therapy, protons, and the risk of second cancers. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2006;65(1):1-7.
64. Rebillard X, Tretarre B. [Epidemiology of urogenital cancers in France]. *La Revue du praticien*. 2007;57(6):595-602.
65. Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M, Winkler A. Reporting results of cancer treatment. *Cancer*. 1981;47(1):207-14.
66. LENT SOMA scales for all anatomic sites. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1995;31(5):1049-91.
67. 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. *Seminars in radiation oncology*. 2003;13(3):176-81.
68. Bentzen SM, Dorr W, Anscher MS, Denham JW, Hauer-Jensen M, Marks LB, et al. Normal tissue effects: reporting and analysis. *Seminars in radiation oncology*. 2003;13(3):189-202.
69. Bentzen SM, Trotti A. Evaluation of early and late toxicities in chemoradiation trials. *J Clin Oncol*. 2007;25(26):4096-103.
70. Watkins-Bruner D, Scott C, Lawton C, DelRowe J, Rotman M, Buswell L, et al. RTOG's first quality of life study--RTOG 90-20: a phase II trial of external beam radiation with etanidazole for locally

advanced prostate cancer. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 1995;33(4):901-6.

71. Denis F, Garaud P, Bardet E, Alfonsi M, Sire C, Germain T, et al. Late toxicity results of the GORTEC 94-01 randomized trial comparing radiotherapy with concomitant radiochemotherapy for advanced-stage oropharynx carcinoma: comparison of LENT/SOMA, RTOG/EORTC, and NCI-CTC scoring systems. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 2003;55(1):93-8.

72. Trotti A, Bentzen SM. The need for adverse effects reporting standards in oncology clinical trials. *J Clin Oncol.* 2004;22(1):19-22.

73. Beitler JJ, Zhang Q, Fu KK, Trotti A, Spencer SA, Jones CU, et al. Final results of local-regional control and late toxicity of RTOG 9003: a randomized trial of altered fractionation radiation for locally advanced head and neck cancer. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 2014;89(1):13-20.

74. Horiot JC, Le Fur R, N'Guyen T, Chenal C, Schraub S, Alfonsi S, et al. Hyperfractionation versus conventional fractionation in oropharyngeal carcinoma: final analysis of a randomized trial of the EORTC cooperative group of radiotherapy. *Radiother Oncol.* 1992;25(4):231-41.

75. Fu KK, Pajak TF, Trotti A, Jones CU, Spencer SA, Phillips TL, et al. A Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) phase III randomized study to compare hyperfractionation and two variants of accelerated fractionation to standard fractionation radiotherapy for head and neck squamous cell carcinomas: first report of RTOG 9003. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 2000;48(1):7-16.

76. Beck-Bornholdt HP, Dubben HH, Liertz-Petersen C, Willers H. Hyperfractionation: where do we stand? *Radiother Oncol.* 1997;43(1):1-21.

77. Carrie C, Grill J, Figarella-Branger D, Bernier V, Padovani L, Habrand JL, et al. Online quality control, hyperfractionated radiotherapy alone and reduced boost volume for standard risk medulloblastoma: long-term results of MSFOP 98. *J Clin Oncol.* 2009;27(11):1879-83.

78. Cowan RA, McBain CA, Ryder WD, Wylie JP, Logue JP, Turner SL, et al. Radiotherapy for muscle-invasive carcinoma of the bladder: results of a randomized trial comparing conventional whole bladder with dose-escalated partial bladder radiotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 2004;59(1):197-207.

79. Olivetto IA, Whelan TJ, Parpia S, Kim DH, Berrang T, Truong PT, et al. Interim cosmetic and toxicity results from RAPID: a randomized trial of accelerated partial breast irradiation using three-dimensional conformal external beam radiation therapy. *J Clin Oncol.* 2013;31(32):4038-45.

80. van der Werf-Messing BH. Carcinoma of the urinary bladder treated by interstitial radiotherapy. *Urol Clin North Am.* 1984;11(4):659-69.

81. Patt HM, Tyree EB, Straube RL, Smith DE. Cysteine Protection against X Irradiation. *Science.* 1949;110(2852):213-4.

82. Takahashi I, Nagai T, Miyaishi K, Maehara Y, Niibe H. Clinical study of the radioprotective effects of Amifostine (YM-08310, WR-2721) on chronic radiation injury. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 1986;12(6):935-8.

83. Utley JF, Quinn CA, White FC, Seaver NA, Bloor CM. Protection of normal tissue against late radiation injury by WR-2721. *Radiation research.* 1981;85(2):408-15.

84. Brizel DM, Wasserman TH, Henke M, Strnad V, Rudat V, Monnier A, et al. Phase III randomized trial of amifostine as a radioprotector in head and neck cancer. *J Clin Oncol.* 2000;18(19):3339-45.

85. Wasserman TH, Brizel DM, Henke M, Monnier A, Eschwege F, Sauer R, et al. Influence of intravenous amifostine on xerostomia, tumor control, and survival after radiotherapy for head-and-neck cancer: 2-year follow-up of a prospective, randomized, phase III trial. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 2005;63(4):985-90.

86. Rades D, Fehlaue F, Bajrovic A, Mahlmann B, Richter E, Alberti W. Serious adverse effects of amifostine during radiotherapy in head and neck cancer patients. *Radiother Oncol.* 2004;70(3):261-4.

87. Anscher MS, Kong FM, Andrews K, Clough R, Marks LB, Bentel G, et al. Plasma transforming growth factor beta1 as a predictor of radiation pneumonitis. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 1998;41(5):1029-35.

88. Berkey FJ. Managing the adverse effects of radiation therapy. *Am Fam Physician.* 2010;82(4):381-8, 94.

89. Moulder JE, Fish BL, Cohen EP. ACE inhibitors and AII receptor antagonists in the treatment and prevention of bone marrow transplant nephropathy. *Curr Pharm Des.* 2003;9(9):737-49.

90. Clarke RE, Tenorio LM, Hussey JR, Toklu AS, Cone DL, Hinojosa JG, et al. Hyperbaric oxygen treatment of chronic refractory radiation proctitis: a randomized and controlled double-blind

crossover trial with long-term follow-up. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2008;72(1):134-43.

91. Delanian S, Porcher R, Balla-Mekias S, Lefaix JL. Randomized, placebo-controlled trial of combined pentoxifylline and tocopherol for regression of superficial radiation-induced fibrosis. *J Clin Oncol*. 2003;21(13):2545-50.

92. Bey E, Prat M, Duhamel P, Benderitter M, Brachet M, Trompier F, et al. Emerging therapy for improving wound repair of severe radiation burns using local bone marrow-derived stem cell administrations. *Wound Repair Regen*. 2010;18(1):50-8.

93. Wyllie A. Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis. In: Bowen I, editor. *Cell death in biology and pathology*. Amsterdam: Springer Netherlands; 1981. p. 9-34.

94. Puck TT, Marcus PI. Action of x-rays on mammalian cells. *J Exp Med*. 1956;103(5):653-66.

95. Hewitt HB, Wilson CW. A survival curve for mammalian cells irradiated in vivo. *Nature*. 1959;183(4667):1060-1.

96. Fertil B, Malaise EP. Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1981;7(5):621-9.

97. Bentzen SM, Christensen JJ, Overgaard J, Overgaard M. Some methodological problems in estimating radiobiological parameters from clinical data. Alpha/beta ratios and electron RBE for cutaneous reactions in patients treated with postmastectomy radiotherapy. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*. 1988;27(2):105-16.

98. Williams MV, Denekamp J, Fowler JF. A review of alpha/beta ratios for experimental tumors: implications for clinical studies of altered fractionation. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1985;11(1):87-96.

99. Chadwick KH, Leenhouts HP. A molecular theory of cell survival. *Physics in medicine and biology*. 1973;18(1):78-87.

100. Joiner MC, Marples B, Lambin P, Short SC, Turesson I. Low-dose hypersensitivity: current status and possible mechanisms. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2001;49(2):379-89.

101. Joiner MC, van der Kogel AJ. *Basic Clinical Radiobiology*. 4th ed. Joiner MC, van der Kogel AJ, editors: Hodder Arnold; 2009. 375 p.

102. Fowler JF. The linear-quadratic formula and progress in fractionated radiotherapy. *The British journal of radiology*. 1989;62(740):679-94.

103. Gray LH, Conger AD, Ebert M, Hornsey S, Scott OC. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *The British journal of radiology*. 1953;26(312):638-48.

104. Hicks KO, Siim BG, Puijn FB, Wilson WR. Oxygen dependence of the metabolic activation and cytotoxicity of tirapazamine: implications for extravascular transport and activity in tumors. *Radiation research*. 2004;161(6):656-66.

105. Zimny M, Gagel B, DiMartino E, Hamacher K, Coenen HH, Westhofen M, et al. FDG--a marker of tumour hypoxia? A comparison with [18F]fluoromisonidazole and pO₂-polarography in metastatic head and neck cancer. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2006;33(12):1426-31.

106. Broerse JJ, Barendsen GW, van Kersen GR. Survival of cultured human cells after irradiation with fast neutrons of different energies in hypoxic and oxygenated conditions. *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine*. 1968;13(6):559-72.

107. Thames HD, Bentzen SM, Turesson I, Overgaard M, Van den Bogaert W. Time-dose factors in radiotherapy: a review of the human data. *Radiother Oncol*. 1990;19(3):219-35.

108. Regaud C, Lacassagne A. Effets histophysiologiques des rayons de Roentgen et de Becquerel-Curie sur les tissus adultes normaux des animaux supérieurs. Fascicule I. Volume I In: Regaud C, editor. *Radiophysiologie et Radiothérapie*. Paris, France: Presses Universitaires de France, ; 1927.

109. Duncan W, MacDougall RH, Kerr GR, Downing D. Adverse effect of treatment gaps in the outcome of radiotherapy for laryngeal cancer. *Radiother Oncol*. 1996;41(3):203-7.

110. Thames HD, Hendry JH, Moore JV, Ang KK, Travis EL. The high steepness of dose-response curves for late-responding normal tissues. *Radiother Oncol*. 1989;15(1):49-53.

111. Lee SP, Leu MY, Smathers JB, McBride WH, Parker RG, Withers HR. Biologically effective dose distribution based on the linear quadratic model and its clinical relevance. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1995;33(2):375-89.

112. Russell KJ, Laramore GE, Griffin TW, Parker RG, Davis LW, Krall JW. Fast neutron radiotherapy for the treatment of carcinoma of the urinary bladder. A review of clinical trials. *Am J Clin Oncol*. 1989;12(4):301-6.

113. Chak LY, Gill PS, Levine AM, Meyer PR, Anselmo JA, Petrovich Z. Radiation therapy for acquired immunodeficiency syndrome-related Kaposi's sarcoma. *J Clin Oncol*. 1988;6(5):863-7.
114. Amoaku WM, Archer DB. Cephalic radiation and retinal vasculopathy. *Eye (Lond)*. 1990;4 (Pt 1):195-203.
115. Robertson JM, Clarke DH, Pevzner MM, Matter RC. Breast conservation therapy. Severe breast fibrosis after radiation therapy in patients with collagen vascular disease. *Cancer*. 1991;68(3):502-8.
116. Takeda Y, Dynan WS. Autoantibodies against DNA double-strand break repair proteins. *Front Biosci*. 2001;6:D1412-22.
117. Phan C, Mindrum M, Silverman C, Paris K, Spanos W. Matched-control retrospective study of the acute and late complications in patients with collagen vascular diseases treated with radiation therapy. *Cancer journal (Sudbury, Mass)*. 2003;9(6):461-6.
118. Lee CE, Prabhu V, Slevin NJ. Collagen vascular diseases and enhanced radiotherapy-induced normal tissue effects--a case report and a review of published studies. *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))*. 2011;23(2):73-8.
119. Touati A, Herve du Penhoat MA, Fayard B, Champion C, Abel F, Gobert F, et al. Biological effects induced by K photo-ionisation in and near constituent atoms of DNA. *Radiation protection dosimetry*. 2002;99(1-4):83-4.
120. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 2001;411(6835):366-74.
121. Pouget JP, Frelon S, Ravanat JL, Testard I, Odin F, Cadet J. Formation of modified DNA bases in cells exposed either to gamma radiation or to high-LET particles. *Radiation research*. 2002;157(5):589-95.
122. Munro TR. The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of Chinese hamster fibroblasts. *Radiation research*. 1970;42(3):451-70.
123. Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*. 2000;408(6811):433-9.
124. Jackson SP. The DNA-damage response: new molecular insights and new approaches to cancer therapy. *Biochem Soc Trans*. 2009;37(Pt 3):483-94.
125. Rubin P, Johnston CJ, Williams JP, McDonald S, Finkelstein JN. A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1995;33(1):99-109.
126. Martin M, Lefaix J, Delanian S. TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2000;47(2):277-90.
127. Mikkelsen RB, Wardman P. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene*. 2003;22(37):5734-54.
128. Wang M, Saha J, Hada M, Anderson JA, Pluth JM, O'Neill P, et al. Novel Smad proteins localize to IR-induced double-strand breaks: interplay between TGFbeta and ATM pathways. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(2):933-42.
129. Warters RL, Hofer KG. Radionuclide toxicity in cultured mammalian cells. Elucidation of the primary site for radiation-induced division delay. *Radiation research*. 1977;69(2):348-58.
130. Szybalski W. X-ray sensitization by halopyrimidines. *Cancer Chemother Rep*. 1974;58(4):539-57.
131. Huang LC, Clarkin KC, Wahl GM. Sensitivity and selectivity of the DNA damage sensor responsible for activating p53-dependent G1 arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(10):4827-32.
132. 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.
133. Sutherland BM, Bennett PV, Sidorkina O, Laval J. Clustered DNA damages induced in isolated DNA and in human cells by low doses of ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(1):103-8.
134. Freifelder D. Mechanism of inactivation of coliphage T7 by x-rays. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1965;54(1):128-34.
135. Kemp LM, Sedgwick SG, Jeggo PA. X-ray sensitive mutants of Chinese hamster ovary cells defective in double-strand break rejoining. *Mutation research*. 1984;132(5-6):189-96.
136. Iliakis G. The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. *Bioessays*. 1991;13(12):641-8.
137. Dewey WC, Furman SC, Miller HH. Comparison of lethality and chromosomal damage induced by x-rays in synchronized Chinese hamster cells in vitro. *Radiation research*. 1970;43(3):561-81.

138. Kaina B, van Zeeland AA, de Groot A, Natarajan AT. DNA repair and chromosomal stability in the alkylating agent-hypersensitive Chinese hamster cell line 27-1. *Mutation research*. 1990;243(3):219-24.
139. Iliakis G, Pantelias GE, Okayasu R, Seamer R. 125I-dUrd-induced chromosome fragments, assayed by premature chromosome condensation, and DNA double-strand breaks have similar repair kinetics in G1-phase CHO-cells. *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine*. 1987;52(5):705-22.
140. 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. *International journal of radiation biology*. 1998;74(5):551-60.
141. Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER, 3rd, Hurov KE, Luo J, et al. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*. 2007;316(5828):1160-6.
142. Renier W, Joubert A, Bencokova Z, Gastaldo J, Massart C, Foray N. Consequences of the bleed-through phenomenon in immunofluorescence of proteins forming radiation-induced nuclear foci. *International journal of radiation biology*. 2007;83(8):543-9.
143. San Filippo J, Sung P, Klein H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem*. 2008;77:229-57.
144. Lieber MR. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem*. 2008;283(1):1-5.
145. Iliakis G. Backup pathways of NHEJ in cells of higher eukaryotes: Cell cycle dependence. *Radiother Oncol*. 2009.
146. Goodarzi AA, Noon AT, Jeggo PA. The impact of heterochromatin on DSB repair. *Biochem Soc Trans*. 2009;37(Pt 3):569-76.
147. Costes SV, Ponomarev A, Chen JL, Nguyen D, Cucinotta FA, Barcellos-Hoff MH. Image-based modeling reveals dynamic redistribution of DNA damage into nuclear sub-domains. *PLoS Comput Biol*. 2007;3(8):e155.
148. Pourquier P, Robert J. [General overview on DNA repair]. *Bulletin du cancer*. 2011;98(3):229-37.
149. West CM, Elyan SA, Berry P, Cowan R, Scott D. A comparison of the radiosensitivity of lymphocytes from normal donors, cancer patients, individuals with ataxia-telangiectasia (A-T) and A-T heterozygotes. *International journal of radiation biology*. 1995;68(2):197-203.
150. 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.
151. 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. *International journal of radiation biology*. 1997;72(3):271-83.
152. 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.
153. Brown JR, Auger KR. Phylogenomics of phosphoinositide lipid kinases: perspectives on the evolution of second messenger signaling and drug discovery. *BMC Evol Biol*. 2011;11:4.
154. Lempiainen H, Halazonetis TD. Emerging common themes in regulation of PI3Ks and PI3Ks. *Embo J*. 2009;28(20):3067-73.
155. You Z, Chahwan C, Bailis J, Hunter T, Russell P. ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1. *Mol Cell Biol*. 2005;25(13):5363-79.
156. Bayliss R, Littlewood T, Stewart M. Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin-beta in nuclear trafficking. *Cell*. 2000;102(1):99-108.
157. Falck J, Coates J, Jackson SP. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature*. 2005;434(7033):605-11.
158. Chan DW, Gately DP, Urban S, Galloway AM, Lees-Miller SP, Yen T, et al. Lack of correlation between ATM protein expression and tumour cell radiosensitivity. *International journal of radiation biology*. 1998;74(2):217-24.
159. 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.
160. 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.

161. 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.
162. Boehrs JK, He J, Halaby MJ, Yang DQ. Constitutive expression and cytoplasmic compartmentalization of ATM protein in differentiated human neuron-like SH-SY5Y cells. *J Neurochem*. 2007;100(2):337-45.
163. Li Y, Xiong H, Yang DQ. Functional switching of ATM: sensor of DNA damage in proliferating cells and mediator of Akt survival signal in post-mitotic human neuron-like cells. *Chin J Cancer*. 2012;31(8):364-72.
164. Marino G, Madeo F, Kroemer G. Autophagy for tissue homeostasis and neuroprotection. *Curr Opin Cell Biol*. 2011;23(2):198-206.
165. Jacquemin V, Rieunier G, Jacob S, Bellanger D, d'Enghien CD, Lauge A, et al. Underexpression and abnormal localization of ATM products in ataxia telangiectasia patients bearing ATM missense mutations. *Eur J Hum Genet*. 2012;20(3):305-12.
166. Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*. 2006;441(7095):880-4.
167. Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y, Mittelman L, Shiloh Y. Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *Embo J*. 2003;22(20):5612-21.
168. Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*. 2003;421(6922):499-506.
169. Kozlov SV, Graham ME, Jakob B, Tobias F, Kijas AW, Tanuji M, et al. Autophosphorylation and ATM activation: additional sites add to the complexity. *J Biol Chem*. 2011;286(11):9107-19.
170. van den Bosch M, Bree RT, Lowndes NF. The MRN complex: coordinating and mediating the response to broken chromosomes. *EMBO Rep*. 2003;4(9):844-9.
171. Lee JH, Paull TT. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science*. 2005;308(5721):551-4.
172. Lavin MF, Kozlov S. ATM activation and DNA damage response. *Cell Cycle*. 2007;6(8):931-42.
173. Riballo E, Kuhne M, Rief N, Doherty A, Smith GC, Recio MJ, et al. A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Mol Cell*. 2004;16(5):715-24.
174. Wu ZH, Shi Y, Tibbetts RS, Miyamoto S. Molecular linkage between the kinase ATM and NF-kappaB signaling in response to genotoxic stimuli. *Science*. 2006;311(5764):1141-6.
175. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(1):49-62.
176. 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. *Exp Cell Res*. 1982;140(1):191-9.
177. 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.
178. McKinnon PJ, Burgoyne LA. Altered cellular morphology and microfilament array in ataxia-telangiectasia fibroblasts. *Eur J Cell Biol*. 1985;39(1):161-6.
179. 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.
180. 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.
181. Okuno Y, Nakamura-Ishizu A, Otsu K, Suda T, Kubota Y. Pathological neoangiogenesis depends on oxidative stress regulation by ATM. *Nat Med*. 2012;18(8):1208-16.
182. Foray N, Colin C, Bourguignon M. 100 years of individual radiosensitivity : how have we forgotten the evidence? *Radiology*. 2012;in press.
183. 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. *Int J Cancer*. 1998;79(6):606-13.
184. Bouchacourt L. Sur la différence de sensibilité aux rayons de Röntgen de la peau des différents sujets, et, sur le même sujet, des différentes régions du corps. *Electricité médicale*. 1911:942-7.

185. Gluckman E, Devergie A, Dutreix J. Radiosensitivity in Fanconi anaemia: application to the conditioning regimen for bone marrow transplantation. *Br J Haematol.* 1983;54(3):431-40.
186. Foray N, Colin C, Bourguignon M. [Radiosensitivity: evidence of an individual factor]. *Med Sci (Paris).* 2013;29(4):397-403.
187. 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. *Radiation research.* 1995;144(1):26-35.
188. Deschavanne PJ, Debieu D, Fertil B, Malaise EP. Re-evaluation of in vitro radiosensitivity of human fibroblasts of different genetic origins. *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine.* 1986;50(2):279-93.
189. Foray N, Verrelle P. [DNA repair and repair diseases: between molecular models and clinical reality]. *Bulletin du cancer.* 2011;98(3):257-75.
190. Weichselbaum RR, Nove J, Little JB. X-ray sensitivity of fifty-three human diploid fibroblast cell strains from patients with characterized genetic disorders. *Cancer Res.* 1980;40(3):920-5.
191. Little JB, Nove J, Strong LC, Nichols WW. Survival of human diploid skin fibroblasts from normal individuals after X-irradiation. *International journal of radiation biology.* 1988;54(6):899-910.
192. Malaise EP, Fertil B, Deschavanne PJ, Chavaudra N, Brock WA. Initial slope of radiation survival curves is characteristic of the origin of primary and established cultures of human tumor cells and fibroblasts. *Radiation research.* 1987;111(2):319-33.
193. Turesson I, Notter G. The influence of fraction size in radiotherapy on the late normal tissue reaction--I: Comparison of the effects of daily and once-a-week fractionation on human skin. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 1984;10(5):593-8.
194. Safwat A, Bentzen SM, Turesson I, Hendry JH. Deterministic rather than stochastic factors explain most of the variation in the expression of skin telangiectasia after radiotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 2002;52(1):198-204.
195. Dahlberg WK, Little JB. Response of dermal fibroblast cultures from patients with unusually severe responses to radiotherapy and from ataxia telangiectasia heterozygotes to fractionated radiation. *Clin Cancer Res.* 1995;1(8):785-90.
196. Swift M, Morrell D, Cromartie E, Chamberlin AR, Skolnick MH, Bishop DT. The incidence and gene frequency of ataxia-telangiectasia in the United States. *Am J Hum Genet.* 1986;39(5):573-83.
197. Swift M, Morrell D, Massey RB, Chase CL. Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia. *N Engl J Med.* 1991;325(26):1831-6.
198. Carney JP, Maser RS, Olivares H, Davis EM, Le Beau M, Yates JR, 3rd, et al. The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell.* 1998;93(3):477-86.
199. Tupler R, Marseglia GL, Stefanini M, Prosperi E, Chessa L, Nardo T, et al. A variant of the Nijmegen breakage syndrome with unusual cytogenetic features and intermediate cellular radiosensitivity. *J Med Genet.* 1997;34(3):196-202.
200. Stewart GS, Maser RS, Stankovic T, Bressan DA, Kaplan MI, Jaspers NG, et al. The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell.* 1999;99(6):577-87.
201. O'Driscoll M, Cerosaletti KM, Girard PM, Dai Y, Stumm M, Kysela B, et al. DNA ligase IV mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency. *Mol Cell.* 2001;8(6):1175-85.
202. van der Burg M, Ijspeert H, Verkaik NS, Turul T, Wiegant WW, Morotomi-Yano K, et al. A DNA-PKcs mutation in a radiosensitive T-B- SCID patient inhibits Artemis activation and nonhomologous end-joining. *J Clin Invest.* 2009;119(1):91-8.
203. O'Marcaigh AS, DeSantes K, Hu D, Pabst H, Horn B, Li L, et al. Bone marrow transplantation for T-B- severe combined immunodeficiency disease in Athabaskan-speaking native Americans. *Bone Marrow Transplant.* 2001;27(7):703-9.
204. Buck D, Malivert L, de Chasseval R, Barraud A, Fondaneche MC, Sanal O, et al. Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell.* 2006;124(2):287-99.
205. Villa A, Notarangelo LD, Roifman CM. Omenn syndrome: inflammation in leaky severe combined immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122(6):1082-6.
206. 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.

207. Stewart GS, Panier S, Townsend K, Al-Hakim AK, Kolas NK, Miller ES, et al. The RIDDLE syndrome protein mediates a ubiquitin-dependent signaling cascade at sites of DNA damage. *Cell*. 2009;136(3):420-34.
208. Revenkova E, Focarelli ML, Susani L, Paulis M, Bassi MT, Mannini L, et al. Cornelia de Lange syndrome mutations in SMC1A or SMC3 affect binding to DNA. *Hum Mol Genet*. 2009;18(3):418-27.
209. Duckworth-Rysiecki G, Taylor AM. Effects of ionizing radiation on cells from Fanconi's anemia patients. *Cancer Res*. 1985;45(1):416-20.
210. Abbott DW, Thompson ME, Robinson-Benion C, Tomlinson G, Jensen RA, Holt JT. BRCA1 expression restores radiation resistance in BRCA1-defective cancer cells through enhancement of transcription-coupled DNA repair. *J Biol Chem*. 1999;274(26):18808-12.
211. Epstein J, Williams JR, Little JB. Deficient DNA repair in human progeroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973;70(4):977-81.
212. Moshell AN, Tarone RE, Barrett SF, Robbins JH. Radiosensitivity in Huntington's disease: implications for pathogenesis and presymptomatic diagnosis. *Lancet*. 1980;1(8158):9-11.
213. Nove J, Tarone RE, Little JB, Robbins JH. Radiation sensitivity of fibroblast strains from patients with Usher's syndrome, Duchenne muscular dystrophy, and Huntington's disease. *Mutation research*. 1987;184(1):29-38.
214. Setlow RB, Faulcon FM, Regan JD. Defective repair of gamma-ray induced DNA damage in xeroderma pigmentosum cells. *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine*. 1976;29(2):125-36.
215. Deschavanne PJ, Chavandra N, Fertil B, Malaise EP. Abnormal sensitivity of some Cockayne's syndrome cell strains to UV- and gamma-rays. Association with a reduced ability to repair potentially lethal damage. *Mutation research*. 1984;131(2):61-70.
216. Botta E, Nardo T, Broughton BC, Marinoni S, Lehmann AR, Stefanini M. Analysis of mutations in the XPD gene in Italian patients with trichothiodystrophy: site of mutation correlates with repair deficiency, but gene dosage appears to determine clinical severity. *Am J Hum Genet*. 1998;63(4):1036-48.
217. Little JB, Nove J, Weichselbaum RR. Abnormal sensitivity of diploid skin fibroblasts from a family with gardner's syndrome to the lethal effects of X-irradiation, ultraviolet light and mitomycin-C. *Mutation research*. 1980;70(2):241-50.
218. Smith PJ, Paterson MC. Enhanced radiosensitivity and defective DNA repair in cultured fibroblasts derived from Rothmund Thomson syndrome patients. *Mutation research*. 1982;94(1):213-28.
219. Imamura O, Fujita K, Itoh C, Takeda S, Furuichi Y, Matsumoto T. Werner and Bloom helicases are involved in DNA repair in a complementary fashion. *Oncogene*. 2002;21(6):954-63.
220. Aurias A, Antoine JL, Assathiany R, Odievre M, Dutrillaux B. Radiation sensitivity of Bloom's syndrome lymphocytes during S and G2 phases. *Cancer Genet Cytogenet*. 1985;16(2):131-6.
221. O'Driscoll M, Ruiz-Perez VL, Woods CG, Jeggo PA, Goodship JA. A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat Genet*. 2003;33(4):497-501.
222. Hannan MA, Sackey K, Sigut D. Cellular radiosensitivity of patients with different types of neurofibromatosis. *Cancer Genet Cytogenet*. 1993;66(2):120-5.
223. Featherstone T, Taylor AM, Harnden DG. Studies on the radiosensitivity of cells from patients with basal cell naevus syndrome. *Am J Hum Genet*. 1983;35(1):58-66.
224. Sanford KK, Tarone RE, Parshad R, Tucker MA, Greene MH, Jones GM. Hypersensitivity to G2 chromatid radiation damage in familial dysplastic naevus syndrome. *Lancet*. 1987;2(8568):1111-6.
225. el-Zein R, Shaw P, Tyring SK, Au WW. Chromosomal radiosensitivity of lymphocytes from skin cancer-prone patients. *Mutation research*. 1995;335(2):143-9.
226. Pereboeva L, Westin E, Patel T, Flaniken I, Lamb L, Klingelhutz A, et al. DNA damage responses and oxidative stress in dyskeratosis congenita. *PLoS One*. 2013;8(10):e76473.
227. Huang CC, Banerjee A, Tan JC, Hou Y. Comparison of radiosensitivity between human hematopoietic cell lines derived from patients with Down's syndrome and from normal persons. *J Natl Cancer Inst*. 1977;59(1):33-6.
228. Cleaver JE, Char D, Charles WC, Rand N. Repair and replication of DNA in hereditary (bilateral) retinoblastoma cells after X-irradiation. *Cancer Res*. 1982;42(4):1343-7.
229. Parshad R, Price FM, Pirolo KF, Chang EH, Sanford KK. Cytogenetic response to G2-phase X irradiation in relation to DNA repair and radiosensitivity in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Radiation research*. 1993;136(2):236-40.

230. Suit H, Goldberg S, Niemierko A, Ancukiewicz M, Hall E, Goitein M, et al. Secondary carcinogenesis in patients treated with radiation: a review of data on radiation-induced cancers in human, non-human primate, canine and rodent subjects. *Radiation research*. 2007;167(1):12-42.
231. Tubiana M. Dose-effect relationship and estimation of the carcinogenic effects of low doses of ionizing radiation: the joint report of the Academie des Sciences (Paris) and of the Academie Nationale de Medecine. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2005;63(2):317-9.
232. Little JB. Radiation carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2000;21(3):397-404.
233. 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 biologies*. 2011;334(2):140-57.
234. 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 U S A*. 2003;100(9):5057-62.
235. Colin C, Foray N. DNA damage induced by mammography in high family risk patients: Only one single view in screening. *Breast*. 2011.
236. Colin C, Granzotto A, Devic C, Viau M, Maalouf M, Vogin G, et al. MRE11 and H2AX biomarkers in the response to low-dose exposure: Balance between individual susceptibility to radiosensitivity and to genomic instability. *International Journal of Low Radiation*. 2011;in press.
237. Colin C, Devic C, Noël A, Rabilloud M, Zobot M-T, Pinet-Isaac S, et al. DNA double-strand breaks induced by mammographic screening procedures in human mammary epithelial cells. *International journal of radiation biology*. 2011;87:1103-12.
238. 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. *International journal of radiation biology*. 2013;in press.
239. Pauwels EK, Bourguignon MH. Radiation Dose Features and Solid Cancer Induction in Pediatric Computed Tomography. *Med Princ Pract*. 2012.
240. Nucléaire AdS. Rapport annuel. ASN, editor. Paris 2011.
241. Mewaldt RA. Galactic cosmic ray composition and energy spectra. *Adv Space Res*. 1994;14(10):737-47.
242. Hamm PB, Billica RD, Johnson GS, Wear ML, Pool SL. Risk of cancer mortality among the Longitudinal Study of Astronaut Health (LSAH) participants. *Aviat Space Environ Med*. 1998;69(2):142-4.
243. Cucinotta FA, Wu H, Shavers MR, George K. Radiation dosimetry and biophysical models of space radiation effects. *Gravit Space Biol Bull*. 2003;16(2):11-8.
244. 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.
245. Fernet M, Hall J. Predictive markers for normal tissue reactions: fantasy or reality? *Cancer Radiother*. 2008;12(6-7):614-8.
246. Burnet NG, Nyman J, Turesson I, Wurm R, Yarnold JR, Peacock JH. Prediction of normal-tissue tolerance to radiotherapy from in-vitro cellular radiation sensitivity. *Lancet*. 1992;339(8809):1570-1.
247. Geara FB, Peters LJ, Ang KK, Wike JL, Brock WA. Prospective comparison of in vitro normal cell radiosensitivity and normal tissue reactions in radiotherapy patients. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1993;27(5):1173-9.
248. Johansen J, Bentzen SM, Overgaard J, Overgaard M. Evidence for a positive correlation between in vitro radiosensitivity of normal human skin fibroblasts and the occurrence of subcutaneous fibrosis after radiotherapy. *International journal of radiation biology*. 1994;66(4):407-12.
249. Alsbeih G, Malone S, Lochrin C, Girard A, Fertil B, Raaphorst GP. Correlation between normal tissue complications and in vitro radiosensitivity of skin fibroblasts derived from radiotherapy patients treated for variety of tumors. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2000;46(1):143-52.
250. Loeffler JS, Harris JR, Dahlberg WK, Little JB. In vitro radiosensitivity of human diploid fibroblasts derived from women with unusually sensitive clinical responses to definitive radiation therapy for breast cancer. *Radiation research*. 1990;121(2):227-31.
251. Smith KC, Hahn GM, Hoppe RT, Earle JD. Radiosensitivity in vitro of human fibroblasts derived from patients with a severe skin reaction to radiation therapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1980;6(11):1573-5.
252. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation research*. 2000;455(1-2):81-95.

253. Nachtrab U, Oppitz U, Flentje M, Stopper H. Radiation-induced micronucleus formation in human skin fibroblasts of patients showing severe and normal tissue damage after radiotherapy. *International journal of radiation biology*. 1998;73(3):279-87.
254. Grote SJ, Joshi GP, Revell SH, Shaw CA. Observations of radiation-induced chromosome fragment loss in live mammalian cells in culture, and its effect on colony-forming ability. *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine*. 1981;39(4):395-408.
255. Cornforth MN, Bedford JS. A quantitative comparison of potentially lethal damage repair and the rejoining of interphase chromosome breaks in low passage normal human fibroblasts. *Radiation research*. 1987;111(3):385-405.
256. Darroudi F, Fomina J, Meijers M, Natarajan AT. Kinetics of the formation of chromosome aberrations in X-irradiated human lymphocytes, using PCC and FISH. *Mutation research*. 1998;404(1-2):55-65.
257. Dunst J, Neubauer S, Becker A, Gebhart E. Chromosomal in-vitro radiosensitivity of lymphocytes in radiotherapy patients and AT-homozygotes. *Strahlenther Onkol*. 1998;174(10):510-6.
258. De Ruyck K, Van Eijkeren M, Claes K, Morthier R, De Paepe A, Vral A, et al. Radiation-induced damage to normal tissues after radiotherapy in patients treated for gynecologic tumors: association with single nucleotide polymorphisms in XRCC1, XRCC3, and OGG1 genes and in vitro chromosomal radiosensitivity in lymphocytes. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2005;62(4):1140-9.
259. Joubert A, Gamo K, 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.
260. 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.
261. Oppitz U, Denzinger S, Nachtrab U, Flentje M, Stopper H. Radiation-induced comet-formation in human skin fibroblasts from radiotherapy patients with different normal tissue reactions. *Strahlenther Onkol*. 1999;175(7):341-6.
262. Li P, Du CR, Xu WC, Shi ZL, Zhang Q, Li ZB, et al. Correlation of dynamic changes in gamma-H2AX expression in peripheral blood lymphocytes from head and neck cancer patients with radiation-induced oral mucositis. *Radiat Oncol*. 2013;8:155.
263. Andreassen CN, Alsner J. Genetic variants and normal tissue toxicity after radiotherapy: a systematic review. *Radiother Oncol*. 2009;92(3):299-309.
264. Greve B, Bolling T, Amler S, Rossler U, Gomolka M, Mayer C, et al. Evaluation of different biomarkers to predict individual radiosensitivity in an inter-laboratory comparison--lessons for future studies. *PLoS One*. 2012;7(10):e47185.
265. Marchetti F, Coleman MA, Jones IM, Wyrobek AJ. Candidate protein biodosimeters of human exposure to ionizing radiation. *International journal of radiation biology*. 2006;82(9):605-39.
266. Menard C, Johann D, Lowenthal M, Muanza T, Sproull M, Ross S, et al. Discovering clinical biomarkers of ionizing radiation exposure with serum proteomic analysis. *Cancer Res*. 2006;66(3):1844-50.
267. Cai XW, Shedden K, Ao X, Davis M, Fu XL, Lawrence TS, et al. Plasma proteomic analysis may identify new markers for radiation-induced lung toxicity in patients with non-small-cell lung cancer. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2010;77(3):867-76.
268. Cai XW, Shedden KA, Yuan SH, Davis MA, Xu LY, Xie CY, et al. Baseline plasma proteomic analysis to identify biomarkers that predict radiation-induced lung toxicity in patients receiving radiation for non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2011;6(6):1073-8.
269. Azria D, Ozsahin M, Kramar A, Peters S, Atencio DP, Crompton NE, et al. Single nucleotide polymorphisms, apoptosis, and the development of severe late adverse effects after radiotherapy. *Clin Cancer Res*. 2008;14(19):6284-8.
270. Werbrouck J, De Ruyck K, Duprez F, Veldeman L, Claes K, Van Eijkeren M, et al. Acute normal tissue reactions in head-and-neck cancer patients treated with IMRT: influence of dose and association with genetic polymorphisms in DNA DSB repair genes. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2009;73(4):1187-95.
271. Zschenker O, Raabe A, Boeckelmann IK, Borstelmann S, Szymczak S, Wellek S, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in ATM, GSTP1, SOD2, TGFB1, XPD and XRCC1 with clinical and cellular radiosensitivity. *Radiother Oncol*. 2010;97(1):26-32.

272. Barnett GC, Coles CE, Elliott RM, Baynes C, Luccarini C, Conroy D, et al. Independent validation of genes and polymorphisms reported to be associated with radiation toxicity: a prospective analysis study. *Lancet Oncol.* 2012;13(1):65-77.
273. Hartsell WF, Scott CB, Dundas GS, Mohiuddin M, Meredith RF, Rubin P, et al. Can serum markers be used to predict acute and late toxicity in patients with lung cancer? Analysis of RTOG 91-03. *Am J Clin Oncol.* 2007;30(4):368-76.
274. Zhao L, Sheldon K, Chen M, Yin MS, Hayman JA, Kalemkerian GP, et al. The predictive role of plasma TGF-beta1 during radiation therapy for radiation-induced lung toxicity deserves further study in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2008;59(2):232-9.
275. Zhao L, Wang L, Ji W, Wang X, Zhu X, Hayman JA, et al. Elevation of plasma TGF-beta1 during radiation therapy predicts radiation-induced lung toxicity in patients with non-small-cell lung cancer: a combined analysis from Beijing and Michigan. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 2009;74(5):1385-90.
276. Ozsahin M, Ozsahin H, Shi Y, Larsson B, Wurgler FE, Crompton NE. Rapid assay of intrinsic radiosensitivity based on apoptosis in human CD4 and CD8 T-lymphocytes. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 1997;38(2):429-40.
277. 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.
278. Bordon E, Henriquez Hernandez LA, Lara PC, Pinar B, Fontes F, Rodriguez Gallego C, et al. Prediction of clinical toxicity in localized cervical carcinoma by radio-induced apoptosis study in peripheral blood lymphocytes (PBLs). *Radiat Oncol.* 2009;4:58.
279. Schnarr K, Boreham D, Sathya J, Julian J, Dayes IS. Radiation-induced lymphocyte apoptosis to predict radiation therapy late toxicity in prostate cancer patients. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 2009;74(5):1424-30.
280. Azria D, Belkacemi Y, Romieu G, Gourgou S, Gutowski M, Zaman K, et al. Concurrent or sequential adjuvant letrozole and radiotherapy after conservative surgery for early-stage breast cancer (CO-HO-RT): a phase 2 randomised trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(3):258-65.
281. Dikomey E, Borgmann K, Hoeller U. Individual radiosensitivity measured with lymphocytes: late effects are the key point: in regard to borgmann et Al. (*Int j radiat oncol biol phys* 2008;71:256-264) and in reply to Dr. Azria. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 2009;74(2):654; author reply -5.
282. Schmitz A, Bayer J, Dechamps N, Goldin L, Thomas G. Heritability of susceptibility to ionizing radiation-induced apoptosis of human lymphocyte subpopulations. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 2007;68(4):1169-77.
283. Zhang H. Molecular signaling and genetic pathways of senescence: Its role in tumorigenesis and aging. *J Cell Physiol.* 2007;210(3):567-74.
284. Iwasaki T, Robertson N, Tsigani T, Finnon P, Scott D, Levine E, et al. Lymphocyte telomere length correlates with in vitro radiosensitivity in breast cancer cases but is not predictive of acute normal tissue reactions to radiotherapy. *International journal of radiation biology.* 2008;84(4):277-84.
285. Russell NS, Lara PC, Grummels A, Hart AA, Coco-Martin JM, Bartelink H, et al. In vitro differentiation characteristics of human skin fibroblasts: correlations with radiotherapy-induced breast fibrosis in patients. *International journal of radiation biology.* 2000;76(2):231-40.
286. Oppitz U, Baier K, Wulf J, Schakowski R, Flentje M. The in vitro colony assay: a predictor of clinical outcome. *International journal of radiation biology.* 2001;77(1):105-10.
287. West CM, Davidson SE, Elyan SA, Valentine H, Roberts SA, Swindell R, et al. Lymphocyte radiosensitivity is a significant prognostic factor for morbidity in carcinoma of the cervix. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 2001;51(1):10-5.
288. Peacock J, Ashton A, Bliss J, Bush C, Eady J, Jackson C, et al. Cellular radiosensitivity and complication risk after curative radiotherapy. *Radiother Oncol.* 2000;55(2):173-8.
289. Rudat V, Dietz A, Nollert J, Conradt C, Weber KJ, Flentje M, et al. Acute and late toxicity, tumour control and intrinsic radiosensitivity of primary fibroblasts in vitro of patients with advanced head and neck cancer after concomitant boost radiochemotherapy. *Radiother Oncol.* 1999;53(3):233-45.
290. Rudat V, Dietz A, Conradt C, Weber KJ, Flentje M. In vitro radiosensitivity of primary human fibroblasts. Lack of correlation with acute radiation toxicity in patients with head and neck cancer. *Radiother Oncol.* 1997;43(2):181-8.
291. Russell NS, Grummels A, Hart AA, Smolders IJ, Borger J, Bartelink H, et al. Low predictive value of intrinsic fibroblast radiosensitivity for fibrosis development following radiotherapy for breast cancer. *International journal of radiation biology.* 1998;73(6):661-70.

292. Brock WA, Tucker SL, Geara FB, Turesson I, Wike J, Nyman J, et al. Fibroblast radiosensitivity versus acute and late normal skin responses in patients treated for breast cancer. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1995;32(5):1371-9.
293. Ramsay J, Birrell G. Normal tissue radiosensitivity in breast cancer patients. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1995;31(2):339-44.
294. Johansen J, Bentzen SM, Overgaard J, Overgaard M. Relationship between the in vitro radiosensitivity of skin fibroblasts and the expression of subcutaneous fibrosis, telangiectasia, and skin erythema after radiotherapy. *Radiother Oncol*. 1996;40(2):101-9.
295. Begg AC, Russell NS, Knaken H, Lebesque JV. Lack of correlation of human fibroblast radiosensitivity in vitro with early skin reactions in patients undergoing radiotherapy. *International journal of radiation biology*. 1993;64(4):393-405.
296. Burnet NG, Nyman J, Turesson I, Wurm R, Yarnold JR, Peacock JH. The relationship between cellular radiation sensitivity and tissue response may provide the basis for individualising radiotherapy schedules. *Radiother Oncol*. 1994;33(3):228-38.
297. Djuzenova CS, Muhl B, Fehn M, Oppitz U, Muller B, Flentje M. Radiosensitivity in breast cancer assessed by the Comet and micronucleus assays. *Br J Cancer*. 2006;94(8):1194-203.
298. Hoeller U, Borgmann K, Bonacker M, Kuhlmeiy A, Bajrovic A, Jung H, et al. Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may be used to predict the risk of fibrosis after radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol*. 2003;69(2):137-44.
299. Barber JB, Burrill W, Spreadborough AR, Levine E, Warren C, Kiltie AE, et al. Relationship between in vitro chromosomal radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes and the expression of normal tissue damage following radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol*. 2000;55(2):179-86.
300. Jones LA, Scott D, Cowan R, Roberts SA. Abnormal radiosensitivity of lymphocytes from breast cancer patients with excessive normal tissue damage after radiotherapy: chromosome aberrations after low dose-rate irradiation. *International journal of radiation biology*. 1995;67(5):519-28.
301. Bourton EC, Plowman PN, Smith D, Arlett CF, Parris CN. Prolonged expression of the gamma-H2AX DNA repair biomarker correlates with excess acute and chronic toxicity from radiotherapy treatment. *Int J Cancer*. 2011;129(12):2928-34.
302. Werbrouck J, Duprez F, De Neve W, Thierens H. Lack of a correlation between gammaH2AX foci kinetics in lymphocytes and the severity of acute normal tissue reactions during IMRT treatment for head and neck cancer. *International journal of radiation biology*. 2011;87(1):46-56.
303. Werbrouck J, De Ruyck K, Beels L, Vral A, Van Eijkeren M, De Neve W, et al. Prediction of late normal tissue complications in RT treated gynaecological cancer patients: potential of the gamma-H2AX foci assay and association with chromosomal radiosensitivity. *Oncol Rep*. 2010;23(2):571-8.
304. Olive PL, Banath JP, Keyes M. Residual gammaH2AX after irradiation of human lymphocytes and monocytes in vitro and its relation to late effects after prostate brachytherapy. *Radiother Oncol*. 2008;86(3):336-46.
305. Rzeszowska-Wolny J, Palyvoda O, Polanska J, Wygoda A, Hancock R. Relationships between acute reactions to radiotherapy in head and neck cancer patients and parameters of radiation-induced DNA damage and repair in their lymphocytes. *International journal of radiation biology*. 2008;84(8):635-42.
306. Pinar B, Lara PC, Lloret M, Bordon E, Nunez MI, Villalobos M, et al. Radiation-induced DNA damage as a predictor of long-term toxicity in locally advanced breast cancer patients treated with high-dose hyperfractionated radical radiotherapy. *Radiation research*. 2007;168(4):415-22.
307. Lopez E, Guerrero R, Nunez MI, del Moral R, Villalobos M, Martinez-Galan J, et al. Early and late skin reactions to radiotherapy for breast cancer and their correlation with radiation-induced DNA damage in lymphocytes. *Breast Cancer Res*. 2005;7(5):R690-8.
308. Twardella D, Popanda O, Helmbold I, Ebbeler R, Benner A, von Fournier D, et al. Personal characteristics, therapy modalities and individual DNA repair capacity as predictive factors of acute skin toxicity in an unselected cohort of breast cancer patients receiving radiotherapy. *Radiother Oncol*. 2003;69(2):145-53.
309. Dickson J, Magee B, Stewart A, West CM. Relationship between residual radiation-induced DNA double-strand breaks in cultured fibroblasts and late radiation reactions: a comparison of training and validation cohorts of breast cancer patients. *Radiother Oncol*. 2002;62(3):321-6.
310. Oppitz U, Schulte S, Stopper H, Baier K, Muller M, Wulf J, et al. In vitro radiosensitivity measured in lymphocytes and fibroblasts by colony formation and comet assay: comparison with clinical acute reactions to radiotherapy in breast cancer patients. *International journal of radiation biology*. 2002;78(7):611-6.

311. Dikomey E, Brammer I, Johansen J, Bentzen SM, Overgaard J. Relationship between DNA double-strand breaks, cell killing, and fibrosis studied in confluent skin fibroblasts derived from breast cancer patients. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2000;46(2):481-90.
312. Alapetite C, Thirion P, de la Rochefordiere A, Cosset JM, Moustacchi E. Analysis by alkaline comet assay of cancer patients with severe reactions to radiotherapy: defective rejoining of radioinduced DNA strand breaks in lymphocytes of breast cancer patients. *Int J Cancer*. 1999;83(1):83-90.
313. Kiltie AE, Orton CJ, Ryan AJ, Roberts SA, Marples B, Davidson SE, et al. A correlation between residual DNA double-strand breaks and clonogenic measurements of radiosensitivity in fibroblasts from preradiotherapy cervix cancer patients. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1997;39(5):1137-44.
314. Bordon E, Henriquez-Hernandez LA, Lara PC, Pinar B, Rodriguez-Gallego C, Lloret M. Role of CD4 and CD8 T-lymphocytes, B-lymphocytes and Natural Killer cells in the prediction of radiation-induced late toxicity in cervical cancer patients. *International journal of radiation biology*. 2011;87(4):424-31.
315. Henriquez-Hernandez LA, Carmona-Vigo R, Pinar B, Bordon E, Lloret M, Nunez MI, et al. Combined low initial DNA damage and high radiation-induced apoptosis confers clinical resistance to long-term toxicity in breast cancer patients treated with high-dose radiotherapy. *Radiat Oncol*. 2011;6:60.
316. Bordon E, Henriquez-Hernandez LA, Lara PC, Ruiz A, Pinar B, Rodriguez-Gallego C, et al. Prediction of clinical toxicity in locally advanced head and neck cancer patients by radio-induced apoptosis in peripheral blood lymphocytes (PBLs). *Radiat Oncol*. 2010;5:4.
317. Crompton NE, Shi YQ, Emery GC, Wisser L, Blattmann H, Maier A, et al. Sources of variation in patient response to radiation treatment. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2001;49(2):547-54.
318. Barber JB, West CM, Kiltie AE, Roberts SA, Scott D. Detection of individual differences in radiation-induced apoptosis of peripheral blood lymphocytes in normal individuals, ataxia telangiectasia homozygotes and heterozygotes, and breast cancer patients after radiotherapy. *Radiation research*. 2000;153(5 Pt 1):570-8.
319. Crompton NE, Miralbell R, Rutz HP, Ersoy F, Sanal O, Wellmann D, et al. Altered apoptotic profiles in irradiated patients with increased toxicity. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1999;45(3):707-14.
320. De Ruyscher D, Severin D, Barnes E, Baumann M, Bristow R, Gregoire V, et al. First report on the patient database for the identification of the genetic pathways involved in patients over-reacting to radiotherapy: GENEPI-II. *Radiother Oncol*. 2010;97(1):36-9.
321. Rattay T, Talbot CJ. Finding the genetic determinants of adverse reactions to radiotherapy. *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))*. 2014;26(5):301-8.
322. Kan MW, Leung LH, Wong W, Lam N. Radiation dose from cone beam computed tomography for image-guided radiation therapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2008;70(1):272-9.
323. Schneider U, Lomax A, Pемler P, Besserer J, Ross D, Lombriser N, et al. The impact of IMRT and proton radiotherapy on secondary cancer incidence. *Strahlenther Onkol*. 2006;182(11):647-52.
324. Hall EJ, Wu CS. Radiation-induced second cancers: the impact of 3D-CRT and IMRT. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2003;56(1):83-8.
325. Xu XG, Bednarz B, Paganetti H. A review of dosimetry studies on external-beam radiation treatment with respect to second cancer induction. *Physics in medicine and biology*. 2008;53(13):R193-241.
326. Followill D, Geis P, Boyer A. Estimates of whole-body dose equivalent produced by beam intensity modulated conformal therapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1997;38(3):667-72.
327. Petti PL, Chuang CF, Smith V, Larson DA. Peripheral doses in CyberKnife radiosurgery. *Med Phys*. 2006;33(6):1770-9.
328. Wilson R. Radiological use of fast protons. *Radiology*. 1946;47:487-91.
329. Cohen L, Schultheiss TE, Hendrickson FR, Mansell J, Saroja KR, Lennox A. Normal tissue reactions and complications following high-energy neutron beam therapy: I. Crude response rates. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1989;16(1):73-8.
330. Duncan W. An evaluation of the results of neutron therapy trials. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*. 1994;33(3):299-306.

331. Maucourt-Boulch D, Baron MH, Pommier P, Weber DC, Mizoe JE, Rochat J, et al. Rationale for carbon ion therapy in high-grade glioma based on a review and a meta-analysis of neutron beam trials. *Cancer Radiother.* 2010;14(1):34-41.
332. von Essen CF, Bagshaw MA, Bush SE, Smith AR, Kligerman MM. Long-term results of pion therapy at Los Alamos. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 1987;13(9):1389-98.
333. Holscheiter M, editor Antiprotons for cancer therapy - a status report. Heavy ions in therapy and space symposium; 2009.
334. Blakeley EA, Roach Mr. Late Effects of Particle Radiations. In: PTCOG48, editor. Heidelberg2009.
335. Peeters A, Grutters JP, Pijls-Johannesma M, Reimoser S, De Ruyscher D, Severens JL, et al. How costly is particle therapy? Cost analysis of external beam radiotherapy with carbon-ions, protons and photons. *Radiother Oncol.* 2010;95(1):45-53.
336. Robert C, Dedes G, Battistoni G, Bohlen TT, Buvat I, Cerutti F, et al. Distributions of secondary particles in proton and carbon-ion therapy: a comparison between GATE/Geant4 and FLUKA Monte Carlo codes. *Physics in medicine and biology.* 2013;58(9):2879-99.
337. Bauer J, Unholtz D, Sommerer F, Kurz C, Haberer T, Herfarth K, et al. Implementation and initial clinical experience of offline PET/CT-based verification of scanned carbon ion treatment. *Radiother Oncol.* 2013;107(2):218-26.
338. Lestand L, Montarou G, Force P, Pauna N. In-beam quality assurance using induced beta(+) activity in hadrontherapy: a preliminary physical requirements study using Geant4. *Physics in medicine and biology.* 2012;57(20):6497-518.
339. Testa M, Bajard M, Chevallier M, Dauvergne D, Freud N, Henriquet P, et al. Real-time monitoring of the Bragg-peak position in ion therapy by means of single photon detection. *Radiation and environmental biophysics.* 2010;49(3):337-43.
340. Alonso J. Review of Ion Beam Therapy: Present and Future. The 7th European Particle Accelerator Conference; June 26-30, 2000; Vienna, Austria: Lawrence Berkeley National Laboratory; 2000.
341. Chu W, editor Overview of Light-Ion Beam Therapy. ICRU-IAEA meeting; 2006; Columbus-Ohio.
342. Nikjoo H, Uehara S, Wilson WE, Hoshi M, Goodhead DT. Track structure in radiation biology: theory and applications. *International journal of radiation biology.* 1998;73(4):355-64.
343. Goodhead DT. Spatial and temporal distribution of energy. *Health physics.* 1988;55(2):231-40.
344. Gerelchuluun A, Hong Z, Sun L, Suzuki K, Terunuma T, Yasuoka K, et al. Induction of in situ DNA double-strand breaks and apoptosis by 200 MeV protons and 10 MV X-rays in human tumour cell lines. *International journal of radiation biology.* 2011;87(1):57-70.
345. Schmid TE, Dollinger G, Beisker W, Hable V, Greubel C, Auer S, et al. Differences in the kinetics of gamma-H2AX fluorescence decay after exposure to low and high LET radiation. *International journal of radiation biology.* 2010;86(8):682-91.
346. Hada M, Sutherland BM. Spectrum of complex DNA damages depends on the incident radiation. *Radiation research.* 2006;165(2):223-30.
347. Goodwin E, Blakely E, Ivery G, Tobias C. Repair and misrepair of heavy-ion-induced chromosomal damage. *Adv Space Res.* 1989;9(10):83-9.
348. Ritter MA, Cleaver JE, Tobias CA. High-LET radiations induce a large proportion of non-rejoining DNA breaks. *Nature.* 1977;266(5603):653-5.
349. Okayasu R, Okada M, Okabe A, Noguchi M, Takakura K, Takahashi S. Repair of DNA damage induced by accelerated heavy ions in mammalian cells proficient and deficient in the non-homologous end-joining pathway. *Radiation research.* 2006;165(1):59-67.
350. Wang H, Zhang X, Wang P, Yu X, Essers J, Chen D, et al. Characteristics of DNA-binding proteins determine the biological sensitivity to high-linear energy transfer radiation. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(10):3245-51.
351. Wang H, Wang X, Zhang P, Wang Y. The Ku-dependent non-homologous end-joining but not other repair pathway is inhibited by high linear energy transfer ionizing radiation. *DNA Repair (Amst).* 2008;7(5):725-33.
352. Xue L, Yu D, Furusawa Y, Okayasu R, Tong J, Cao J, et al. Regulation of ATM in DNA double strand break repair accounts for the radiosensitivity in human cells exposed to high linear energy transfer ionizing radiation. *Mutation research.* 2009;670(1-2):15-23.
353. Hofman-Huther H, Scholz M, Rave-Frank M, Virsik-Kopp P. Induction of reproductive cell death and chromosome aberrations in radioresistant tumour cells by carbon ions. *International journal of radiation biology.* 2004;80(6):423-35.

354. Sekine E, Okada M, Matsufuji N, Yu D, Furusawa Y, Okayasu R. High LET heavy ion radiation induces lower numbers of initial chromosome breaks with minimal repair than low LET radiation in normal human cells. *Mutation research*. 2008;652(1):95-101.
355. George K, Durante M, Willingham V, Wu H, Yang TC, Cucinotta FA. Biological effectiveness of accelerated particles for the induction of chromosome damage measured in metaphase and interphase human lymphocytes. *Radiation research*. 2003;160(4):425-35.
356. Hada M, Zhang Y, Feiveson A, Cucinotta FA, Wu H. Association of inter- and intrachromosomal exchanges with the distribution of low- and high-LET radiation-induced breaks in chromosomes. *Radiation research*. 2011;176(1):25-37.
357. Jakob B, Splinter J, Durante M, Taucher-Scholz G. Live cell microscopy analysis of radiation-induced DNA double-strand break motion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(9):3172-7.
358. Loucas B, editor Unrejoined cytogenetic damage related to heavy ion irradiation. . Heavy ions in therapy and space symposium; 2009; Cologne, Germany.
359. Zhang Y, Lim CU, Williams ES, Zhou J, Zhang Q, Fox MH, et al. NBS1 knockdown by small interfering RNA increases ionizing radiation mutagenesis and telomere association in human cells. *Cancer Res*. 2005;65(13):5544-53.
360. Taucher-Scholz G, Heilmann J, Kraft G. Induction and rejoining of DNA double-strand breaks in CHO cells after heavy ion irradiation. *Adv Space Res*. 1996;18(1-2):83-92.
361. Katz R, Sharma SC. Heavy particles in therapy: an application of track theory. *Physics in medicine and biology*. 1974;19(4):413-35.
362. Wang H, Liu S, Zhang P, Zhang S, Naidu M, Wang H, et al. S-phase cells are more sensitive to high-linear energy transfer radiation. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2009;74(4):1236-41.
363. Jinno-Oue A, Shimizu N, Hamada N, Wada S, Tanaka A, Shinagawa M, et al. Irradiation with carbon ion beams induces apoptosis, autophagy, and cellular senescence in a human glioma-derived cell line. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2010;76(1):229-41.
364. Maalouf M, Alphonse G, Colliaux A, Beuve M, Trajkovic-Bodennec S, Battiston-Montagne P, et al. Different mechanisms of cell death in radiosensitive and radioresistant p53 mutated head and neck squamous cell carcinoma cell lines exposed to carbon ions and x-rays. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2009;74(1):200-9.
365. Ding LH, Park S, Peyton M, Girard L, Xie Y, Minna JD, et al. Distinct transcriptome profiles identified in normal human bronchial epithelial cells after exposure to gamma-rays and different elemental particles of high Z and energy. *BMC Genomics*. 2013;14:372.
366. Girdhani S, Sachs R, Hlatky L. Biological effects of proton radiation: what we know and don't know. *Radiation research*. 2013;179(3):257-72.
367. Suetens A, Moreels M, Quintens R, Chiriotti S, Tabury K, Michaux A, et al. Carbon ion irradiation of the human prostate cancer cell line PC3: a whole genome microarray study. *Int J Oncol*. 2014;44(4):1056-72.
368. Kurpinski K, Jang DJ, Bhattacharya S, Rydberg B, Chu J, So J, et al. Differential effects of x-rays and high-energy 56Fe ions on human mesenchymal stem cells. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2009;73(3):869-77.
369. Weyrather WK, Ritter S, Scholz M, Kraft G. RBE for carbon track-segment irradiation in cell lines of differing repair capacity. *International journal of radiation biology*. 1999;75(11):1357-64.
370. Hawkins RB. The relationship between the sensitivity of cells to high-energy photons and the RBE of particle radiation used in radiotherapy. *Radiation research*. 2009;172(6):761-76.
371. Jones B. The apparent increase in the β -parameter of the linear quadratic model with increased linear energy transfer during fast neutron irradiation. *The British journal of radiology*. 2010;83(989):433-6.
372. Ando K, Kase Y. Biological characteristics of carbon-ion therapy. *International journal of radiation biology*. 2009;85(9):715-28.
373. Harada H. How can we overcome tumor hypoxia in radiation therapy? *Journal of radiation research*. 2011;52(5):545-56.
374. Barendsen GW, Walter HM. Effects of Different Ionizing Radiations on Human Cells in Tissue Culture. Iv. Modification of Radiation Damage. *Radiation research*. 1964;21:314-29.
375. Michael BD, Prise KM. A multiple-radical model for radiation action on DNA and the dependence of OER on LET. *International journal of radiation biology*. 1996;69(3):351-8.
376. Ward JF. The complexity of DNA damage: relevance to biological consequences. *International journal of radiation biology*. 1994;66(5):427-32.
377. Meesungnoen J, Jay-Gerin JP. High-LET ion radiolysis of water: oxygen production in tracks. *Radiation research*. 2009;171(3):379-86.

378. Blakely EA, Tobias CA, Yang TC, Smith KC, Lyman JT. Inactivation of human kidney cells by high-energy monoenergetic heavy-ion beams. *Radiation research*. 1979;80(1):122-60.
379. Wenzl T, Wilkens JJ. Modelling of the oxygen enhancement ratio for ion beam radiation therapy. *Physics in medicine and biology*. 2011;56(11):3251-68.
380. Broerse JJ, Barendsen GW. Measurements of biological effects and physical parameters of neutrons from the $^9\text{Be}(^3\text{He},n)^{11}\text{C}$ reaction; possibilities for fast neutron radiotherapy. *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine*. 1967;13(2):189-94.
381. Baumann M, Krause M, Hill R. Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(7):545-54.
382. Masunaga S, Sakurai Y, Tanaka H, Hirayama R, Matsumoto Y, Uzawa A, et al. Radiosensitivity of pimonidazole-unlabelled intratumour quiescent cell population to gamma-rays, accelerated carbon ion beams and boron neutron capture reaction. *The British journal of radiology*. 2013;86(1021):20120302.
383. Bertrand G, Maalouf M, Boivin A, Battiston-Montagne P, Beuve M, Levy A, et al. Targeting head and neck cancer stem cells to overcome resistance to photon and carbon ion radiation. *Stem cell reviews*. 2014;10(1):114-26.
384. Cui X, Oonishi K, Tsujii H, Yasuda T, Matsumoto Y, Furusawa Y, et al. Effects of carbon ion beam on putative colon cancer stem cells and its comparison with X-rays. *Cancer Res*. 2011;71(10):3676-87.
385. Masunaga S, Ando K, Uzawa A, Hirayama R, Furusawa Y, Koike S, et al. Radiobiologic significance of response of intratumor quiescent cells in vivo to accelerated carbon ion beams compared with gamma-rays and reactor neutron beams. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2008;70(1):221-8.
386. Takahashi Y, Teshima T, Kawaguchi N, Hamada Y, Mori S, Madachi A, et al. Heavy ion irradiation inhibits in vitro angiogenesis even at sublethal dose. *Cancer Res*. 2003;63(14):4253-7.
387. Grabham P, Sharma P, Bigelow A, Geard C. Two distinct types of the inhibition of vasculogenesis by different species of charged particles. *Vasc Cell*. 2013;5(1):16.
388. Akino Y, Teshima T, Kihara A, Kodera-Suzumoto Y, Inaoka M, Higashiyama S, et al. Carbon-ion beam irradiation effectively suppresses migration and invasion of human non-small-cell lung cancer cells. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2009;75(2):475-81.
389. Goetze K, Scholz M, Taucher-Scholz G, Mueller-Klieser W. The impact of conventional and heavy ion irradiation on tumor cell migration in vitro. *International journal of radiation biology*. 2007;83(11-12):889-96.
390. Ogata T, Teshima T, Kagawa K, Hishikawa Y, Takahashi Y, Kawaguchi A, et al. Particle irradiation suppresses metastatic potential of cancer cells. *Cancer Res*. 2005;65(1):113-20.
391. Karger CP, Peschke P, Sanchez-Brandelik R, Scholz M, Debus J. Radiation tolerance of the rat spinal cord after 6 and 18 fractions of photons and carbon ions: experimental results and clinical implications. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2006;66(5):1488-97.
392. Withers HR, Thames HD, Jr., Peters LJ. Biological bases for high RBE values for late effects of neutron irradiation. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1982;8(12):2071-6.
393. Fournier C, Scholz M, Weyrather WK, Rodemann HP, Kraft G. Changes of fibrosis-related parameters after high- and low-LET irradiation of fibroblasts. *International journal of radiation biology*. 2001;77(6):713-22.
394. Haase O, Rodemann HP. Fibrosis and cytokine mechanisms: relevant in hadron therapy? *Radiother Oncol*. 2004;73 Suppl 2:S144-7.
395. Tungjai M, Whorton EB, Rithidech KN. Persistence of apoptosis and inflammatory responses in the heart and bone marrow of mice following whole-body exposure to $(^2)(^8)\text{Si}$ ions. *Radiation and environmental biophysics*. 2013;52(3):339-50.
396. Jones B. Modelling carcinogenesis after radiotherapy using Poisson statistics: implications for IMRT, protons and ions. *J Radiol Prot*. 2009;29(2A):A143-57.
397. Bettega D, Calzolari P, Hessel P, Stucchi CG, Weyrather WK. Neoplastic transformation induced by carbon ions. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2009;73(3):861-8.
398. 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.
399. Halg RA, Besserer J, Boschung M, Mayer S, Lomax AJ, Schneider U. Measurements of the neutron dose equivalent for various radiation qualities, treatment machines and delivery techniques in radiation therapy. *Physics in medicine and biology*. 2014;59(10):2457-68.

400. Schneider U, Lomax A, Lombriser N. Comparative risk assessment of secondary cancer incidence after treatment of Hodgkin's disease with photon and proton radiation. *Radiation research*. 2000;154(4):382-8.
401. Ng AK, Mauch PM. Late effects of Hodgkin's disease and its treatment. *Cancer journal (Sudbury, Mass)*. 2009;15(2):164-8.
402. Yonai S, Furukawa T, Inaniwa T. Measurement of Neutron Ambient Dose Equivalent in Carbon-Ion Radiotherapy with an Active Scanned Delivery System. *Radiation protection dosimetry*. 2013.
403. Kanai T, Endo M, Minohara S, Miyahara N, Koyama-ito H, Tomura H, et al. Biophysical characteristics of HIMAC clinical irradiation system for heavy-ion radiation therapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1999;44(1):201-10.
404. Inaniwa T, Furukawa T, Kase Y, Matsufuji N, Toshito T, Matsumoto Y, et al. Treatment planning for a scanned carbon beam with a modified microdosimetric kinetic model. *Physics in medicine and biology*. 2010;55(22):6721-37.
405. Mairani A, Brons S, Cerutti F, Fasso A, Ferrari A, Kramer M, et al. The FLUKA Monte Carlo code coupled with the local effect model for biological calculations in carbon ion therapy. *Physics in medicine and biology*. 2010;55(15):4273-89.
406. Fokas E, Kraft G, An H, Engenhardt-Cabillic R. Ion beam radiobiology and cancer: time to update ourselves. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1796(2):216-29.
407. Terasawa T, Dvorak T, Ip S, Raman G, Lau J, Trikalinos TA. Systematic review: charged-particle radiation therapy for cancer. *Ann Intern Med*. 2009;151(8):556-65.
408. Schulz-Ertner D, Tsujii H. Particle radiation therapy using proton and heavier ion beams. *J Clin Oncol*. 2007;25(8):953-64.
409. Tsujii H, Mizoe J, Kamada T, Baba M, Tsuji H, Kato H, et al. Clinical Results of Carbon Ion Radiotherapy at NIRS. *J Radiat Res (Tokyo)*. 2007;48 Suppl A:A1-A13.
410. Goitein M. Trials and tribulations in charged particle radiotherapy. *Radiother Oncol*. 2010;95(1):23-31.
411. Suit HD. Assessment of relative merits of proton and carbon ion beam therapy PTCOG 48 Meeting of the Particle Therapy Co-Operative Group. 2009.
412. Blakely EA, Chang PY. Late effects from hadron therapy. *Radiother Oncol*. 2004;73 Suppl 2:S134-40.
413. Schulz-Ertner D, Nikoghosyan A, Didinger B, Debus J. Carbon ion radiation therapy for chordomas and low grade chondrosarcomas--current status of the clinical trials at GSI. *Radiother Oncol*. 2004;73 Suppl 2:S53-6.
414. Uhl M, Mattke M, Welzel T, Roeder F, Oelmann J, Habl G, et al. Highly effective treatment of skull base chordoma with carbon ion irradiation using a raster scan technique in 155 patients: First long-term results. *Cancer*. 2014.
415. Thariat J, Bolle S, Demizu Y, Marcy PY, Hu Y, Santini J, et al. New techniques in radiation therapy for head and neck cancer: IMRT, CyberKnife, protons, and carbon ions. Improved effectiveness and safety? Impact on survival? *Anticancer Drugs*. 2011;22(7):596-606.
416. Ng AK, Kenney LB, Gilbert ES, Travis LB. Secondary malignancies across the age spectrum. *Seminars in radiation oncology*. 2010;20(1):67-78.
417. Lodge M, Pijls-Johannesma M, Stirk L, Munro AJ, De Ruyscher D, Jefferson T. A systematic literature review of the clinical and cost-effectiveness of hadron therapy in cancer. *Radiother Oncol*. 2007;83(2):110-22.
418. Jakel O, Land B, Combs SE, Schulz-Ertner D, Debus J. On the cost-effectiveness of Carbon ion radiation therapy for skull base chordoma. *Radiother Oncol*. 2007;83(2):133-8.
419. Mobaraki A, Ohno T, Yamada S, Sakurai H, Nakano T. Cost-effectiveness of carbon ion radiation therapy for locally recurrent rectal cancer. *Cancer Sci*. 2010;101(8):1834-9.
420. Joubert A, Zimmerman KM, Bencokova Z, Gastaldo J, Chavaudra N, Favaudon V, 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):107-25.
421. Velier J, Kim M, Schwarz C, Kim TW, Sapp E, Chase K, et al. Wild-type and mutant huntingtins function in vesicle trafficking in the secretory and endocytic pathways. *Exp Neurol*. 1998;152(1):34-40.
422. Trovo-Marqui AB, Tajara EH. Neurofibromin: a general outlook. *Clin Genet*. 2006;70(1):1-13.
423. Fisher DZ, Chaudhary N, Blobel G. cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(17):6450-4.

424. 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.
425. Gordon LB, Kleinman ME, Miller DT, Neuberger DS, Giobbie-Hurder A, Gerhard-Herman M, et al. Clinical trial of a farnesyltransferase inhibitor in children with Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(41):16666-71.
426. Fritz G, Henninger C, Huelsenbeck J. Potential use of HMG-CoA reductase inhibitors (statins) as radioprotective agents. *Br Med Bull.* 2011;97:17-26.
427. Combs SE, Djosanjh M, Potter R, Orrechia R, Haberer T, Durante M, et al. Towards clinical evidence in particle therapy: ENLIGHT, PARTNER, ULICE and beyond. *Journal of radiation research.* 2013;54 Suppl 1:i6-12.
428. Chauvet B, Mahé M, Maingon P, Mazon J, Mornex F. Livre blanc de la radiothérapie en France 2013. Douze objectifs pour améliorer un des traitements majeurs du cancer *Cancer Radiother.* 2013;17 - suppl 1:S1-S72.
429. Wambersie A, Hendry JH, Andreo P, DeLuca PM, Gahbauer R, Menzel H, et al. The RBE issues in ion-beam therapy: conclusions of a joint IAEA/ICRU working group regarding quantities and units. *Radiation protection dosimetry.* 2006;122(1-4):463-70.
430. Ando K, Koike S, Uzawa A, Takai N, Fukawa T, Furusawa Y, et al. Biological gain of carbon-ion radiotherapy for the early response of tumor growth delay and against early response of skin reaction in mice. *J Radiat Res (Tokyo).* 2005;46(1):51-7.
431. McConnell P, Dash RC, Chilukuri R, Pietrobon R, Johnson K, Annechiarico R, et al. The cancer translational research informatics platform. *BMC medical informatics and decision making.* 2008;8:60.
432. Ablert D, Garonna A, Carli C, Dosanjh M, Peach K. Feasibility study for a biomedical experimental facility based on LEIR at CERN. *Journal of radiation research.* 2013;54 Suppl 1:i162-7.
433. Chua ML, Horn S, Somaiah N, Davies S, Gothard L, A'Hern R, et al. DNA double-strand break repair and induction of apoptosis in ex vivo irradiated blood lymphocytes in relation to late normal tissue reactions following breast radiotherapy. *Radiation and environmental biophysics.* 2014;53(2):355-64.
434. Arlett CF, Green MH, Priestley A, Harcourt SA, Mayne LV. 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. *International journal of radiation biology.* 1988;54(6):911-28.
435. Kushihiro J, Nakamura N, Kyoizumi S, Nishiki M, Dohi K, Akiyama M. Absence of correlations between radiosensitivities of human T-lymphocytes in G0 and skin fibroblasts in log phase. *Radiation research.* 1990;122(3):326-32.
436. Geara FB, Peters LJ, Ang KK, Wike JL, Sivon SS, Guttenberger R, et al. Intrinsic radiosensitivity of normal human fibroblasts and lymphocytes after high- and low-dose-rate irradiation. *Cancer Res.* 1992;52(22):6348-52.
437. Green MH, Arlett CF, Cole J, Harcourt SA, Priestley A, Waugh AP, et al. Comparative human cellular radiosensitivity: III. Gamma-radiation survival of cultured skin fibroblasts and resting T-lymphocytes from the peripheral blood of the same individual. *International journal of radiation biology.* 1991;59(3):749-65.
438. Deschavanne PJ, Fertil B. A review of human cell radiosensitivity in vitro. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 1996;34(1):251-66.
439. 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.* 2013;49(3):1200-11.
440. Joubert A, Foray N. [Intrinsic radiosensitivity and DNA double-strand breaks in human cells]. *Cancer Radiother.* 2007;11(3):129-42.
441. Joubert A, Foray N. Repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in human cells: History, progress and controversies.: Nova publisher; 2007.
442. 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 Discov Today.* 2011;16(7-8):332-8.
443. Guo Z, Kozlov S, Lavin MF, Person MD, Paull TT. ATM activation by oxidative stress. *Science.* 2010;330(6003):517-21.
444. Bencokova Z, Kaufmann MR, Pires IM, Lecane PS, Giaccia AJ, Hammond EM. ATM activation and signaling under hypoxic conditions. *Mol Cell Biol.* 2009;29(2):526-37.

445. Alexander A, Walker CL. Differential localization of ATM is correlated with activation of distinct downstream signaling pathways. *Cell Cycle*. 2010;9(18):3685-6.
446. Watters D, Kedar P, Spring K, Bjorkman J, Chen P, Gatei M, et al. Localization of a portion of extranuclear ATM to peroxisomes. *J Biol Chem*. 1999;274(48):34277-82.
447. Abraham RT. PI 3-kinase related kinases: 'big' players in stress-induced signaling pathways. *DNA Repair (Amst)*. 2004;3(8-9):883-7.
448. 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.
449. Kim J, Wong PK. Loss of ATM impairs proliferation of neural stem cells through oxidative stress-mediated p38 MAPK signaling. *Stem Cells*. 2009;27(8):1987-98.
450. Wang X, Martindale JL, Liu Y, Holbrook NJ. The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochem J*. 1998;333 (Pt 2):291-300.
451. Leslie NR, Bennett D, Lindsay YE, Stewart H, Gray A, Downes CP. Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN. *Embo J*. 2003;22(20):5501-10.
452. Shiloh Y, Ziv Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(4):197-210.
453. Ismail IH, Nystrom S, Nygren J, Hammarsten O. Activation of ataxia telangiectasia mutated by DNA strand break-inducing agents correlates closely with the number of DNA double strand breaks. *J Biol Chem*. 2005;280(6):4649-55.
454. Mosammamarast N, Pemberton LF. Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators. *Trends Cell Biol*. 2004;14(10):547-56.
455. Fahrenkrog B, Aebi U. The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(10):757-66.
456. Raices M, D'Angelo MA. Nuclear pore complex composition: a new regulator of tissue-specific and developmental functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(11):687-99.
457. Imamoto N. Diversity in nucleocytoplasmic transport pathways. *Cell Struct Funct*. 2000;25(4):207-16.
458. Nachury MV, Weis K. The direction of transport through the nuclear pore can be inverted. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(17):9622-7.
459. Kau TR, Way JC, Silver PA. Nuclear transport and cancer: from mechanism to intervention. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(2):106-17.
460. Lewis MD, Roberts BJ. Role of nuclear and cytoplasmic localization in the tumour-suppressor activity of the von Hippel-Lindau protein. *Oncogene*. 2003;22(26):3992-7.
461. Zettler ME, Prociuk MA, Austria JA, Zhong G, Pierce GN. Oxidized low-density lipoprotein retards the growth of proliferating cells by inhibiting nuclear translocation of cell cycle proteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(4):727-32.
462. McLane LM, Corbett AH. Nuclear localization signals and human disease. *IUBMB Life*. 2009;61(7):697-706.
463. Sabherwal N, Schneider KU, Blaschke RJ, Marchini A, Rappold G. Impairment of SHOX nuclear localization as a cause for Leri-Weill syndrome. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 14):3041-8.
464. Kaiser FJ, Brega P, Raff ML, Byers PH, Gallati S, Kay TT, et al. Novel missense mutations in the TRPS1 transcription factor define the nuclear localization signal. *Eur J Hum Genet*. 2004;12(2):121-6.
465. Shoubridge C, Tan MH, Fullston T, Cloosterman D, Coman D, McGillivray G, et al. Mutations in the nuclear localization sequence of the Aristaless related homeobox; sequestration of mutant ARX with IPO13 disrupts normal subcellular distribution of the transcription factor and retards cell division. *Pathogenetics*. 2010;3:1.
466. Mizutani A, Matsuzaki A, Momoi MY, Fujita E, Tanabe Y, Momoi T. Intracellular distribution of a speech/language disorder associated FOXP2 mutant. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;353(4):869-74.
467. Bjorses P, Halonen M, Palvimo JJ, Kolmer M, Aaltonen J, Ellonen P, et al. Mutations in the AIRE gene: effects on subcellular location and transactivation function of the autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy protein. *Am J Hum Genet*. 2000;66(2):378-92.
468. Da Costa L, Tchernia G, Gascard P, Lo A, Meerpohl J, Niemeyer C, et al. Nucleolar localization of RPS19 protein in normal cells and mislocalization due to mutations in the nucleolar localization signals in 2 Diamond-Blackfan anemia patients: potential insights into pathophysiology. *Blood*. 2003;101(12):5039-45.

469. Djordjevic S, Zhang X, Bartlam M, Ye S, Rao Z, Danpure CJ. Structural implications of a G170R mutation of alanine:glyoxylate aminotransferase that is associated with peroxisome-to-mitochondrion mistargeting. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2010;66(Pt 3):233-6.
470. Dreuillet C, Harper M, Tillit J, Kress M, Ernoult-Lange M. Mislocalization of human transcription factor MOK2 in the presence of pathogenic mutations of lamin A/C. *Biol Cell.* 2008;100(1):51-61.
471. Cordeddu V, Di Schiavi E, Pennacchio LA, Ma'ayan A, Sarkozy A, Fodale V, et al. Mutation of SHOC2 promotes aberrant protein N-myristoylation and causes Noonan-like syndrome with loose anagen hair. *Nat Genet.* 2009;41(9):1022-6.
472. Mendes HF, van der Spuy J, Chapple JP, Cheetham ME. Mechanisms of cell death in rhodopsin retinitis pigmentosa: implications for therapy. *Trends Mol Med.* 2005;11(4):177-85.
473. Robben JH, Knoers NV, Deen PM. Cell biological aspects of the vasopressin type-2 receptor and aquaporin 2 water channel in nephrogenic diabetes insipidus. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006;291(2):F257-70.
474. Payne AS, Kelly EJ, Gitlin JD. Functional expression of the Wilson disease protein reveals mislocalization and impaired copper-dependent trafficking of the common H1069Q mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(18):10854-9.
475. Tanaka AR, Abe-Dohmae S, Ohnishi T, Aoki R, Morinaga G, Okuhira K, et al. Effects of mutations of ABCA1 in the first extracellular domain on subcellular trafficking and ATP binding/hydrolysis. *J Biol Chem.* 2003;278(10):8815-9.
476. Hoover BR, Reed MN, Su J, Penrod RD, Kotilinek LA, Grant MK, et al. Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron.* 2010;68(6):1067-81.
477. Winton MJ, Igaz LM, Wong MM, Kwong LK, Trojanowski JQ, Lee VM. Disturbance of nuclear and cytoplasmic TAR DNA-binding protein (TDP-43) induces disease-like redistribution, sequestration, and aggregate formation. *J Biol Chem.* 2008;283(19):13302-9.
478. Vance C, Rogelj B, Hortobagyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, Sreedharan J, et al. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science.* 2009;323(5918):1208-11.
479. Dansen TB, Burgering BM. Unravelling the tumor-suppressive functions of FOXO proteins. *Trends Cell Biol.* 2008;18(9):421-9.
480. Tatematsu K, Yoshimoto N, Koyanagi T, Tokunaga C, Tachibana T, Yoneda Y, et al. Nuclear-cytoplasmic shuttling of a RING-IBR protein RBCK1 and its functional interaction with nuclear body proteins. *J Biol Chem.* 2005;280(24):22937-44.
481. Trotman LC, Wang X, Alimonti A, Chen Z, Teruya-Feldstein J, Yang H, et al. Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. *Cell.* 2007;128(1):141-56.
482. Ratan R, Mason DA, Sinnot B, Goldfarb DS, Fleming RJ. *Drosophila* importin alpha1 performs paralog-specific functions essential for gametogenesis. *Genetics.* 2008;178(2):839-50.
483. Kim IS, Kim DH, Han SM, Chin MU, Nam HJ, Cho HP, et al. Truncated form of importin alpha identified in breast cancer cell inhibits nuclear import of p53. *J Biol Chem.* 2000;275(30):23139-45.
484. Reid SP, Leung LW, Hartman AL, Martinez O, Shaw ML, Carbonnelle C, et al. Ebola virus VP24 binds karyopherin alpha1 and blocks STAT1 nuclear accumulation. *J Virol.* 2006;80(11):5156-67.
485. Dahl E, Kristiansen G, Gottlob K, Klamann I, Ebner E, Hinzmann B, et al. Molecular profiling of laser-microdissected matched tumor and normal breast tissue identifies karyopherin alpha2 as a potential novel prognostic marker in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;12(13):3950-60.
486. Kodiha M, Tran D, Qian C, Morogan A, Presley JF, Brown CM, et al. Oxidative stress mislocalizes and retains transport factor importin-alpha and nucleoporins Nup153 and Nup88 in nuclei where they generate high molecular mass complexes. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1783(3):405-18.
487. Miyamoto Y, Saiwaki T, Yamashita J, Yasuda Y, Kotera I, Shibata S, et al. Cellular stresses induce the nuclear accumulation of importin alpha and cause a conventional nuclear import block. *J Cell Biol.* 2004;165(5):617-23.
488. Satterly N, Tsai PL, van Deursen J, Nussenzveig DR, Wang Y, Faria PA, et al. Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(6):1853-8.
489. Gustin KE, Sarnow P. Effects of poliovirus infection on nucleo-cytoplasmic trafficking and nuclear pore complex composition. *Embo J.* 2001;20(1-2):240-9.
490. Shu W, Chen Y, Wu Q, Li R, Cui G. Deguelin represses both the expression of nucleophosmin and some nucleoporins: Nup88 and Nup214 in Jurkat cells. *Biol Pharm Bull.* 2008;31(1):27-32.

491. Agudo D, Gomez-Esquer F, Martinez-Arribas F, Nunez-Villar MJ, Pollan M, Schneider J. Nup88 mRNA overexpression is associated with high aggressiveness of breast cancer. *Int J Cancer*. 2004;109(5):717-20.
492. Wesierska-Gadek J, Klima A, Ranftler C, Komina O, Hanover J, Invernizzi P, et al. Characterization of the antibodies to p62 nucleoporin in primary biliary cirrhosis using human recombinant antigen. *J Cell Biochem*. 2008;104(1):27-37.
493. Chahine MN, Blackwood DP, Dibrov E, Richard MN, Pierce GN. Oxidized LDL affects smooth muscle cell growth through MAPK-mediated actions on nuclear protein import. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;46(3):431-41.
494. Zhang X, Chen S, Yoo S, Chakrabarti S, Zhang T, Ke T, et al. Mutation in nuclear pore component NUP155 leads to atrial fibrillation and early sudden cardiac death. *Cell*. 2008;135(6):1017-27.
495. Basel-Vanagaite L, Muncher L, Strausberg R, Pasmanik-Chor M, Yahav M, Rainshtein L, et al. Mutated nup62 causes autosomal recessive infantile bilateral striatal necrosis. *Ann Neurol*. 2006;60(2):214-22.
496. Cronshaw JM, Matunis MJ. The nuclear pore complex protein ALADIN is mislocalized in triple A syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(10):5823-7.
497. Bodgi L, Granzotto A, Devic C, Vogin G, Lesne A, Bottollier JF, et al. A single formula to describe radiation-induced protein relocalization: towards a mathematical definition of individual radiosensitivity. *J Teor Biol*. 2013;In press.
498. Chua ML, Somaiah N, Bourne S, Daley F, A'Hern R, Nuta O, et al. Inter-individual and inter-cell type variation in residual DNA damage after in vivo irradiation of human skin. *Radiother Oncol*. 2011;99(2):225-30.
499. Lacour B, Guyot-Goubin A, Guissou S, Bellec S, Desandes E, Clavel J. Incidence of childhood cancer in France: National Children Cancer Registries, 2000-2004. *Eur J Cancer Prev*. 2010;19(3):173-81.
500. Desandes E, Bonnay S, Berger C, Brugieres L, Demeocq F, Laurence V, et al. Pathways of care for adolescent patients with cancer in France from 2006 to 2007. *Pediatr Blood Cancer*. 2012;58(6):924-9.
501. Rogers PB, Plowman PN, Harris SJ, Arlett CF. Four radiation hypersensitivity cases and their implications for clinical radiotherapy. *Radiother Oncol*. 2000;57(2):143-54.
502. Rube CE, Fricke A, Schneider R, Simon K, Kuhne M, Fleckenstein J, et al. DNA repair alterations in children with pediatric malignancies: novel opportunities to identify patients at risk for high-grade toxicities. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2010;78(2):359-69.

Index

A

aberrations chromosomiques... 70, 72, 79, 100, 131, 137, 193
AIEA 205
apoptose .. 17, 55, 68, 72, 81, 92, 99, 105, 106, 110, 132, 137, 195, 210, 211, 212, 216
ATM..... 17, 21, 67, 73, 74, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 87, 88, 95, 105, 131, 152, 153, 162, 167, 178, 190, 210, 213, 214, 215, 216, 218, 222, 226

B

balayage actif 118, 122, 138, 139, 140
Bergonié 26, 84, 192, 193
BEVALAC 121, 146

C

cancer radio induit 93, 95, 146, 148, 167
CDB.... 17, 65, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 81, 86, 94, 95, 98, 101, 102, 130, 131, 132, 133, 135, 150, 151, 152, 162, 190, 196, 199, 200, 209, 210, 212, 213, 216, 222, 223
CELLINE 150, 152, 153, 213
cellules souches 54, 60, 68, 133, 135, 192
Consequential Late Effects 53
COPERNIC 153, 162, 167, 213, 254
CTCAE 17, 19, 20, 47, 48, 163, 167, 199
CTV 17, 23, 25, 179, 182
curiethérapie 43, 52, 112, 115
Cyberknife 115, 118

D

DNA-PKcs 77, 79, 80, 81, 88, 131, 212
dose isoefficace 180, 184, 204, 227

E

EBR..... 17, 120, 121, 126, 128, 129, 133, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 180, 184, 204, 205, 206, 208
effet oxygène 58, 59, 62, 141
effets précoces 19, 27, 47, 106, 195
effets tardifs 19, 27, 35, 43, 51, 103, 106, 120, 146, 210
en parallèle 26
en série 26
ETOILE 143, 144, 148, 154, 160, 179, 185

F

fibroblastes 68, 72, 80, 85, 86, 99, 102, 107, 108, 110, 111, 137, 150, 153, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 211, 225, 226
fibrose .. 26, 27, 54, 62, 63, 104, 108, 109, 111, 137, 211, 221
fragmentation 127, 129, 184, 204
France HADRON 208

G

gantry 124, 160
GTV 17, 23, 25, 179

H

H2AX.... 17, 74, 75, 79, 81, 102, 103, 150, 169, 213, 226
hadrons 120, 123, 125, 141, 144
HDV 17, 30, 31, 32, 35, 36, 115, 182
Huntington 89, 152, 222
hyperfractionnement 52
hypersensibilité aux faibles doses 214, 222
hypofractionnement 118, 122, 204, 227
hypoxie 58, 59, 134, 191, 214

I

ICRU 179, 203, 205
immobilisation 116, 161, 165, 187, 188, 207
immunofluorescence .. 17, 74, 75, 77, 102, 150, 152, 167, 169, 172, 173, 196, 199, 209, 210, 222, 223, 225, 226
IMRT 17, 32, 114, 116, 155
inflammation 53, 68, 88, 137
instabilité génomique 68, 94, 101, 102, 134
ionisations 62, 64, 125, 127, 130
ions carbone62, 119, 121, 122, 131, 132, 134, 135, 137, 142, 146, 148, 149, 154, 155, 157, 159, 165, 179, 180, 181, 184, 185, 186, 187, 188, 205, 206, 208, 228

L

LEM 139, 205
LQ 17, 56, 57, 62, 140, 222, 223
lymphocytes ... 80, 99, 100, 102, 105, 106, 107, 110, 111, 169, 195, 210, 211, 212

M

métadonnées 160, 161, 165, 185, 206
microdépôts d'énergie 64, 65, 71
modèle MKM 139
mort mitotique 55, 68, 72, 99, 106, 107, 132, 190, 196, 216
MRE1174, 75, 81, 88, 102, 131, 151, 152, 167, 169, 210, 213, 226
MRN 74, 75, 76, 81, 88, 214

N

NBS1 74, 79, 80, 81, 88
neutrons 59, 62, 117, 119, 120, 124, 125, 126, 134, 135, 136, 138, 139, 142, 205
neutrons secondaires 138
NLS 17, 79, 218, 220, 221

P

pATM 4, 82, 103, 131, 153, 162, 167, 169, 178, 199, 210, 213
phase III 201, 202, 207, 209
PI3K 79, 215, 216
pic de Bragg 118, 121, 125, 127, 129, 131, 134, 138, 139, 141, 203, 227
polymorphismes 105, 197
protons 96, 119, 120, 121, 124, 125, 126, 127, 134, 139, 143, 144, 145, 146, 155, 208
PRV 204
PTV 17, 23, 180, 182, 203

Q

QUANTEC 32, 51
quark 124

R

radicaux libres 65, 215
radioesthésie 28, 84
radiolyse de l'eau 65
radiosensibilisation 208
radiosensibilité cellulaire 56, 71, 106, 107, 111, 153, 190, 191, 192
radiosensibilité individuelle. 4, 22, 52, 82, 83, 84, 85, 86, 92, 93, 96, 97, 98, 102, 105, 106, 110, 112, 154, 155, 158, 162, 167, 189, 190, 195, 197, 199, 209, 214, 217, 225, 226, 227, 228
radiosensibilité intrinsèque... 24, 54, 55, 56, 68, 133, 190, 195
RCMI ... 17, 32, 43, 44, 114, 117, 118, 119, 120, 205
recombinaison homologue 58, 75, 76, 77, 82, 89, 212, 216
Regaud 30, 52, 59, 60, 192
réparation . 58, 59, 61, 63, 66, 68, 70, 71, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 82, 86, 87, 88, 89, 91, 92, 95, 99, 100, 101, 102, 109, 130, 131, 150, 152, 153, 162, 190, 191, 196, 199, 209, 210, 212, 213, 214, 216, 222, 223
réparatose 79, 83, 167, 199
RT en conditions stéréotaxiques 114
RTOG 42, 45, 46, 47, 48, 146, 163, 199

S

sclérodermie 63, 89
SF2 17, 55, 88, 97, 102, 151, 193, 212
stress oxydatif 68, 73, 80, 82, 214, 215
suture 17, 74, 76, 77, 82, 86, 88, 131, 150, 152, 213, 216

T

TD5/5 21, 30
TEL. 17, 62, 118, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 141, 158, 180, 184, 204, 227
TEP 17, 25, 59, 113, 127, 143, 144
tests clonogéniques 55, 85, 99, 190, 211
tests prédictifs 22, 85, 96, 97, 98, 99, 110, 195, 211, 214, 226
Toxicité tardive 135
trafic nucléo-cytoplasmique 153, 220
transit cyto-nucléaire 4, 103, 153, 162, 190, 199, 213, 223
transit nucléo-cytoplasmique 217, 220

U

ULICE... 17, 116, 154, 157, 159, 160, 161, 164, 165, 166, 179, 181, 185, 187, 188, 189, 201, 203, 205, 227, 228, 254

V

VMAT 114, 155
voie de la réponse cellulaire aux dommages radio induits de l'ADN 79, 98

W

western blots 162

α

α/β 57, 58, 59, 61, 133, 137, 140, 142, 208, 223

Annexes

1. Délivrables publiées dans le cadre du projet ULICE

- 1.1. D 2.1 Harmonization of concepts and terms for volume and dose-volume parameters in photon, proton and carbon-ion therapy (annexe 1.1)
- 1.2. D 2.3 Description of tasks with a proposal for potential structures for clinical research in ULICE (annexe 1.2)
- 1.3. D 2.5 Harmonization and recommendations for prescribing and reporting absorbed doses and dose-volume histograms based on 3D and 4D concepts (annexe 1.3)
- 1.4. D 2.7 Pattern of tumor relapse and “toxicogenesis” in Carbon Ion RT (CIRT) (annexe 1.4)
- 1.5. D 2.9 Integrated Concept of 3D/4D Absorbed Dose and Variations of Biological Effects with RBE, Fractionation and Overall Time (annexe 1.5)
- 1.6. D 7.3 Services for data acquisition and processing (annexe 1.6)
- 1.7. D 9.1 Report on scientific and technical aspects of the existing and planned infrastructures, on demographic and geographic aspects of the European facility distribution and on clinical criteria of eligibility for Hadrontherapy (annexe 1.7)
- 1.8. D 10.3 Written protocols standardizing features of the active facility (annexe 1.8) & D 10.5 ULICE website with standardized protocols [month 42] (annexe 1.9)
- 1.9. D 11.11 Design and Implementation of Clinical Trials (annexe 1.10) & D 11.8 Dedicated Space on the ULICE web site for clinical access (annexe 1.11)

2. Protocoles d’essais cliniques en rapport avec la thèse

- 2.1. COPERNIC
- 2.2. EVIRAS
- 2.3. PrEVIRAS
- 2.4. ARPEGE

N° d'ordre 218-2014

Année 2014

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON
Délivrée par
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON 1

École Doctorale Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire

DIPLOME DE DOCTORAT
SCIENCES DE LA VIE
(Arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 10 octobre 2014
par
Guillaume VOGIN

**Amélioration de la tolérance de la radiothérapie par
une approche individuelle radiobiologique et une
démarche conceptuelle unifiée en hadronthérapie.**

ANNEXES

Sommaire

Délivrables publiés dans le cadre du projet ULICE

- 1.1. D 2.1 Harmonization of concepts and terms for volume and dose-volume parameters in photon, proton and carbon-ion therapy (annexe 1.1)
- 1.2. D 2.3 Description of tasks with a proposal for potential structures for clinical research in ULICE (annexe 1.2)
- 1.3. D 2.5 Harmonization and recommendations for prescribing and reporting absorbed doses and dose-volume histograms based on 3D and 4D concepts (annexe 1.3)
- 1.4. D 2.7 Pattern of tumor relapse and “toxicogenesis” in Carbon Ion RT (CIRT) (annexe 1.4)
- 1.5. D 2.9 Integrated Concept of 3D/4D Absorbed Dose and Variations of Biological Effects with RBE, Fractionation and Overall Time (annexe 1.5)
- 1.6. D 7.3 Services for data acquisition and processing (annexe 1.6)
- 1.7. D 9.1 Report on scientific and technical aspects of the existing and planned infrastructures, on demographic and geographic aspects of the European facility distribution and on clinical criteria of eligibility for Hadrontherapy (annexe 1.7)
- 1.8. D 10.3 Written protocols standardizing features of the active facility (annexe 1.8) & D 10.5 ULICE website with standardized protocols [month 42] (annexe 1.9)
- 1.9. D 11.11 Design and Implementation of Clinical Trials (annexe 1.10) & D 11.8 Dedicated Space on the ULICE web site for clinical access (annexe 1.11)

Protocoles d'essais cliniques en rapport avec la thèse

- 1.1. COPERNIC
- 1.2. EVIRAS
- 1.3. PrEVIRAS
- 1.4. ARPEGE



Project co-funded by the European Commission within the FP7 (2007 – 2013)
Grant agreement no.: 228436

ULICE Union of Light-Ion Centres in Europe

Project type: Combination of CP & CSA
Integrating Activities / e-Infrastructures / Preparatory phase

Start date of project: 1st September 2009 Duration: 48 months

D.JRA 2.1 – Harmonisation of concepts and terms for volume and dose-volume parameters in photon, proton and carbon-ion therapy

Delivery date: M18 2011/02/28

WP n° and title: WP 2 – Concepts and terms for dose volume parameters and for outcome assessment in hadron-therapy integrating applied biology, medical physics and clinical medicine in ULICE

WP leader: Ramona Mayer, Jacques Balosso

Reporting period: 1st

	Name	Partner	
Author(s):	André Wambersie, Richard Pötter, Thomas Schreiner, Ramona Mayer, Ulrike Mock, Guillaume Vogin, Jacques Balosso, Piero Fossati, Stephanie Combs	MUW, MEDA, UCBL, CNAO, UKL-HD	2011/02/28
Contributor(s):			
Pillar coordinator:	Richard Pötter	MUW	
Approved by TPB and CPO		signature	

Dissemination Level		
PU	Public	X
PP	Restricted to other programme participants (including the Commission Services)	
RE	Restricted to a group specified by the consortium (including the Commission Services)	
CO	Confidential, only for members of the consortium (including the Commission Services)	

TABLE OF CONTENTS

LIST OF ABBREVIATIONS AND DEFINITIONS	5
PUBLISHABLE SUMMARY	9
CONTENTS AND SPECIFIC DOCUMENT STRUCTURE	11
1 General introduction	11
2 General oncological concepts applicable to all forms of therapy	13
2.1 Gross tumour volume (GTV)	13
2.1.1 Definition	13
2.1.2 Variation with imaging technique or approach	13
2.1.3 Identification of functional sub-GTV(s)	17
2.1.4 Variation of GTV during treatment	17
2.2 Clinical target volume (CTV)	18
2.2.1 Definition	18
2.2.2 Delineation of the CTV	20
2.2.3 Risk related CTVs	22
2.2.4 Adaptive concept for CTV assessment	22
2.3 Organ at risk (OAR)	22
3 Radiation-oncology concepts	24
3.1 Planning target volume (PTV)	24
3.1.1 From CTV to PTV	24
3.1.2 Internal margin (internal target volume, ITV)	24
3.1.3 Set-up margin (external)	24
3.1.4 Definition and characteristics of the PTV	24
3.1.5 The PTV for different irradiation modalities	26
3.2 Treated volume (TV)	28
3.3 Reference volume	28
3.4 Planning organ at risk volume (PRV)	29
3.4.1 Definition	29
3.4.2 Overlap between PRV and PTV	29
3.5 Remaining volume at risk (RVR)	30
4 Radiobiological concepts in ion-beam therapy	31
4.1 From absorbed dose to biological effect and clinical outcome	31
4.2 The relative biological effectiveness (RBE) concept	31
4.2.1 Definition of RBE	31
4.2.2 Reference radiation quality	32
4.2.3 Relevant RBE experimental data	32
4.2.4 Interpretation of the RBE data based on microdosimetric spectra	34
4.3 The isoeffective dose	39
4.3.1 Need for weighting of absorbed dose	39
4.3.2 Definition	39
4.3.3 Reference treatment modality	40

5	Open questions on reporting ion-beam therapy	42
5.1	Absorbed dose in ion-beam therapy	42
5.2	Absorbed dose and isoeffective dose	42
5.3	Clinical constraints	43
5.4	An historical dilemma	43
	CONCLUSIONS	45
	REFERENCES	47

LIST OF ABBREVIATIONS AND DEFINITIONS

<i>D</i>	Absorbed dose is a measure of the energy deposited per unit mass of medium by ionising radiation, and so has the unit Gy.
<i>D</i> _{IsoE}	Isoeffective dose is the absorbed dose that delivered under the reference conditions would produce the same biological effect in a given system as the actual treatment, all other conditions being the same.
<i>D</i> _{ref}	Dose of the reference radiation quality selected for the definition of the RBE.
<i>D</i> _{test}	Dose of the test radiation quality used for the definition of the RBE.
<i>W</i> _{IsoE}	Weighing factor which takes into account the effects of all factors that could influence the outcome (mainly, dose per fraction, overall time, dose rate and radiation quality). Multiplication of weighing factor with absorbed dose results in the isoeffective dose.
AJCC	American Joint Committee on Cancer is an organisation best known for defining and popularising cancer staging standards.
BIPM	Bureau International des Poids et Mesures (International Bureau of Weights and Measures) is an international standards organisation established to maintain the International System of Units (SI) under the terms of the Metre Convention.
CT	Computed Tomography is a medical imaging technique using a large series of two-dimensional X-ray images.
CTV	Clinical Target Volume is a volume of tissue that contains a demonstrable GTV and/or subclinical malignant disease at a certain probability considered relevant for therapy.
DVH	Dose-Volume Histogram is a concept used in radiation treatment planning.
FDG	Fluorodeoxyglucose is a radiopharmaceutical used in PET imaging.
fMRI	functional Magnetic Resonance Imaging is a type of specialised MRI scan measuring the hemodynamic response (change in blood flow) related to neural activity.
GSI	Gesellschaft für SchwerIonenforschung – Centre for Heavy Ion Research located at Darmstadt, Germany
GTV	Gross Tumour Volume is the gross demonstrable extent and location of a tumour.
Gy	Gray is the name of the special unit of absorbed dose of ionising radiation, i. e. the absorption of one joule of ionising radiation by one kilogram of matter.
HIMAC	Heavy Ion Medical ACcelerator located at the National Institute of Radiological Sciences in Chiba, Japan.
HIT	Heidelberger Ionenstrahl-Therapiezentrum – Heidelberg Ion-Beam Therapy Centre located at the Heidelberg University Hospital, Germany.
HSG	Human Submandibular Gland cell line.
ICD-O	International Classification of Diseases for Oncology is a domain specific extension of the International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems for tumour diseases. This classification is widely used by cancer registries.

ICRP	International Commission on Radiological Protection is an advisory body providing recommendations and guidance on radiation protection.
ICRU	International Commission on Radiation Units and Measurements is a standardisation body set up in 1925 by the International Congress of Radiology.
IMRT	Intensity-Modulated Radiation Therapy is an advanced type of high-precision radiation therapy technique.
ITV	Internal Target Volume is defined as the CTV plus a margin which takes into account uncertainties in size and shape of the CTV and its position/movements within the patient.
LEM	Local Effect Model used for the treatment planning system for ion therapy TRiP at GSI and HIT, Germany.
LET	Linear Energy Transfer is a measure of the energy transferred to material as an ionising particle travels through it.
MRI	Magnetic Resonance Imaging is a medical imaging technique using a powerful magnetic field.
MRI-FLAIR	Magnetic Resonance Imaging FLuid Attenuated Inversion Recovery is a pulse sequence (inversion recovery technique that nulls fluids) used in MRI.
NIRS	National Institute of Radiological Sciences located at Chiba, Japan
OAR	Organ At Risk or critical normal structures are tissues, which if irradiated could suffer significant morbidity, and thus might influence the treatment planning and/or the dose prescription.
OER	Oxygen Enhancement Ratio in radiobiology refers to the enhancement of therapeutic or detrimental effect of ionising radiation due to the presence of oxygen.
PET	Positron Emission Tomography is a medical imaging technique using pairs of gamma rays emitted indirectly by a positron-emitting radionuclide.
PET-CT	Positron Emission Tomography and Computed Tomography is a medical imaging device which combines in a single gantry system both a PET and a CT.
PRV	Planning Organ at risk Volume is, in analogy with the PTV, a geometrical concept considering uncertainties and variations in the position of organs at risk during treatment.
PTV	Planning Target Volume is a geometrical concept introduced for treatment planning and evaluation. It is the recommended tool to shape dose distributions to ensure that the prescribed dose will actually be delivered to all parts of the CTV, with a clinically acceptable probability, despite geometrical uncertainties such as organ motion and set-up variations. It is used for dose prescription and reporting.
RBE	Relative Biological Effectiveness is defined as the ratio of a dose of a reference radiation quality to the dose of the test radiation quality required to cause the same biological level of effect, all other conditions being the same.
RVR	Remaining Volume at Risk is the volume that is within the imaged region of the patient, and outside all delineated OARs and CTVs.

SOPB	Spread-Out Bragg peak is an overlap of several pristine Bragg peaks at staggered depths.
SUV	Standardised Uptake Value is often used in PET imaging for (semi-)quantitative analysis of dynamic data. It is useful for a simple analysis of FDG images, e. g. to monitor the progress of disease during cancer therapy.
TNM	Classification of Malignant Tumours is a cancer staging system that describes the extent of cancer in a patient's body. T describes the size of the tumour and whether it has invaded nearby tissue; N describes regional lymph nodes that are involved; M describes distant metastasis (spread of cancer from one body part to another).
TPS	Treatment Planning System used in radiation therapy for planning the doses in the tumour and the surrounding healthy tissue (critical organs).
TRiP	Treatment planning for Particles a treatment planning system for ion therapy developed at GSI and used at HIT, Germany.
TV	Treated Volume is the volume of tissue that receives at least the dose specified by the radiation oncologist in charge of the patient and considered as appropriate to achieve the goal of the treatment within the bounds of acceptable complications.
UICC	International Union Against Cancer is a non-governmental organisation dedicated exclusively to the global control of cancer.
VOI	Volume Of Interest is a generic term that can be used to refer to any volume that needs to be identified. The GTV, PTV, and OAR are examples of specifically-named VOIs.
WHO	World Health Organisation is a specialised agency of the United Nations that acts as a coordinating authority on international public health.

PUBLISHABLE SUMMARY

Uniformity and agreement upon methods and concepts for reporting doses and volumes in radiation oncology are the basis for a fruitful exchange of clinical information and treatment outcomes. The volumes used in (radiation) oncology have been defined in several ICRU reports and described in the first part of this deliverable. Gross tumour volume (GTV), clinical tumour volume (CTV), and organ(s) at risk (OAR) correspond to known (GTV) and/or suspected (CTV) tumour infiltration, and volumes of normal tissues that might be irradiated and affect the treatment prescription (OAR). These volumes have an anatomical/physiological basis and are independent of the of treatment modality. Modern imaging techniques now allow to identify within the GTV “sub-volumes” (hypoxic, proliferation zones) that may require different dose levels. Another group of volumes are defined which depend to a large extent on the treatment modality: internal target volume (ITV), planning target volume (PTV), treated volume (TV), planning organ at risk volume (PRV), and remaining volume at risk (RVR).

Although absorbed dose is an important quantity in radiation therapy, the relation between absorbed dose and biological effects is not unique but depends on several factors including dose per fraction, absorbed dose rate, dose range, overall treatment time, radiation quality (LET), dose homogeneity, etc. In addition, their influence depends on the biological systems and effects considered (early/late). For prescribing and reporting ion-beam therapy absorbed dose alone is thus not sufficient and relative biological effectiveness (RBE) and isoeffective dose (D_{IsoE}) need to be specified. The practical application of these concepts (absorbed dose and/or isoeffective dose, DVH and/or dose at reference point(s)) is still a matter of debate.

CONTENTS AND SPECIFIC DOCUMENT STRUCTURE

1 General introduction

The exchange of clinical information and treatment results is essential for the development of – and progress in – radiation oncology. This goal can be achieved only through a general harmonisation of reporting patient data and treatment conditions. It requires uniformity and agreement upon methods used to determine the doses and points and/or volumes where those doses are specified. Such reports on prescribing, recording, and reporting treatments have already been published for photons- [27, 29, 32], electrons- [30] and proton-based techniques [31] by the ICRU and IAEA. A large part of Sections 1 to 3 are based on the successive ICRU reports on the topic.

Following volumes were defined and some of them are schematically illustrated in Figure 1:

- gross tumour volume (GTV)
- clinical target volume (CTV)
- planning target volume (PTV)
- internal target volume (ITV)
- treated volume (TV)
- organ at risk (OAR)
- planning organ at risk volume (PRV)
- remaining volume at risk (RVR)

Several volume concepts related to both tumour and normal tissues (i. e. GTV, CTV, OAR) have been defined for use in treatment planning and reporting. These concepts are applicable to any type of radiation-therapy modality, including proton and ion-beam therapy. Delineation of these volumes is

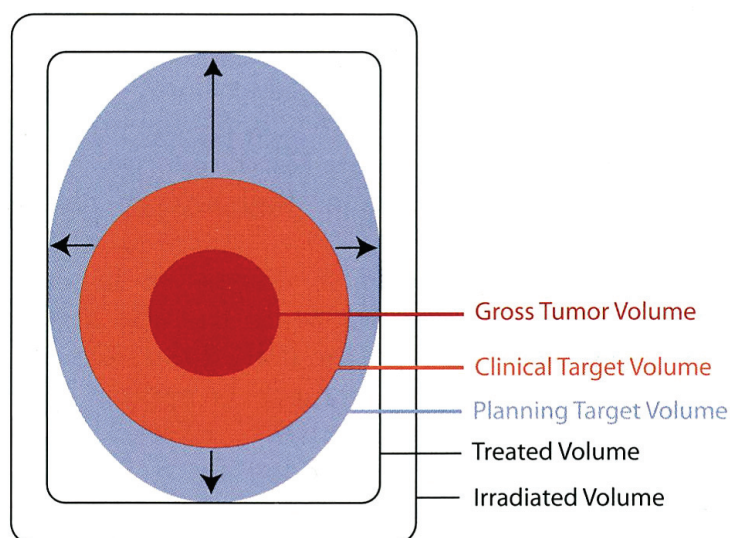


Figure 1: Schematic illustration of the different volumes as defined in ICRU Report 5 [27] and in the following reports up to 83 [29–32].

an obligatory step as absorbed dose cannot be prescribed, recorded, and reported without specification of target volumes and volumes of normal tissues at risk.

The GTV, CTV, and OAR correspond to volumes of known (GTV), and/or suspected (CTV) tumour infiltration, and volumes of normal tissues that might be irradiated and affect the treatment prescription (OAR), respectively. These volumes have an anatomical/physiological basis. In contrast the ITV, PTV, and PRV are concepts introduced to ensure that the absorbed dose delivered to the corresponding GTV, CTV, and OAR match the prescription constraints. Proton and ion-beam therapy do not exhibit any particularity in defining such volumes in comparison with conventional photon-beam therapy.

The GTV is obtained and delineated using various diagnostic (or imaging) modalities. The selection of the CTV and OAR is a medical decision which results from a clinical judgement involving many factors. Unlike the ITV, PTV, and PRV that depend on the technical modality and irradiation technique, the GTV and CTV are oncological concepts and their delineation should be influenced only by oncological considerations; it is thus irrelevant whether photons, electrons, protons, ions or any other radiation are employed. It is important not to let the intended irradiation modality affect how the GTV and CTV volumes are delineated as one may wish to combine, compare or retrospectively analyse treatment plans for more than one treatment modality.

Three-dimensional imaging, selection and delineation of the GTV, CTV, and OAR are crucial steps in a chain starting with the decision to treat the patient with radiation therapy and ending with the response evaluation and the follow-up in search of recurrence and treatment-induced morbidity. It should be understood that, even though GTV, CTV, and OAR are purely oncological or anatomical concepts, a representation of these volumes is used in the planning process, e. g. outlined on a CT scan. These representations (volumes) should be considered a snapshot of the anatomy at a given time.

All volumes should be related and represent the patient's anatomy in treatment conditions. Movements or anatomical changes in the patient anatomy/morphology can be visualised by using a time series (four-dimensional) representation, e. g. daily-repeated or respiration-correlated CT scans, where the fourth dimension, i. e. time, allows visualisation of time-dependent changes in morphology. Future planning systems will be able to handle four-dimensional scans, e. g. by displaying a sine loop on the screen. In principle, this technology will make it possible to generate four-dimensional representations of a patient. 4D-CT technology is more and more used, e. g. for lung tumour treatment.

Although absorbed dose is a fundamental quality in radiation therapy there is no unique relationship between absorbed dose and induced biological effects. Therefore the two radiobiological concepts relative biological effectiveness (RBE) and isoeffective dose (D_{IsoE}) are presented in Section 4. The RBE quantifies the difference in biological effects for different radiation qualities when all other conditions are the same. The isoeffective dose weighting factor (W_{IsoE}) has been designed for comparing applications of different radiation therapy modalities. It depends on the biological system, biological effects (e. g. late/early), radiation type, and fractionation scheme for which it has been selected. Similar to the RBE the W_{IsoE} is therefore meaningful only to the extent that these factors are reported.

As already mentioned above the volume concepts and the radiobiological concepts in ion-beam radiation therapy have been referred in several ICRU and IAEA reports. Although there is general agreement on these concepts there is no common way for reporting dose in carbon-ion radiation therapy up to now. This causes mainly from the different approaches and independent developments regarding treatment planning systems in the last decades. These open issues are addressed in Section 5.

2 General oncological concepts applicable to all forms of therapy

The volumes described in the following section are based on anatomical and imaging data linked only to the patient condition. Their definitions are independent on the treatment modality.

2.1 Gross tumour volume (GTV)

2.1.1 Definition

The *gross tumour volume (GTV)* is the gross demonstrable extent and location of the tumour. The GTV may consist of a primary tumour (primary tumour GTV or GTV-T), metastatic regional node(s) (nodal GTV or GTV-N), or distant metastasis (metastatic GTV, or GTV-M). In general, different GTVs are defined for the primary tumour and the regional node(s). But in some particular clinical situations, it might well be that the metastatic node cannot be distinguished from the primary tumour, e. g. a nasopharyngeal undifferentiated carcinoma infiltrating postero-laterally into the retro-pharyngeal space including possible infiltrated nodes. In such situations, a single GTV encompassing both the primary tumour and the node(s) may be delineated. In case of post-operative irradiation after assumed complete surgical resection (R0 or R1 resection), there is no GTV to define, and only a CTV needs to be delineated.

Although in the vast majority of cases, the GTV refers to a malignant tumour, the terminology may also be used for non-malignant disease treated with ionising radiation, e. g. glomus tumour of the carotid body, arterio-venous malformation, and pituitary adenoma. There are several reasons to describe and report the GTV in a complete and accurate way. Firstly, it is required for staging, e. g. according to the TNM system. Secondly, an adequate dose must be delivered to the whole GTV to obtain local tumour control. Thirdly, evaluation of the regression of the GTV might be needed for redefining the CTV and the PTV (see Sections 2.2 and 3.1) during the course of treatment. Fourthly, changes of the GTV during treatment might be predictive of treatment outcome.

Although the concept of GTV itself is simple and straightforward, accurate delineation of the GTV may be difficult for obvious pathological reasons (no clear “borders”) as shown in Figures 2 and 3. These figures illustrate how some tumours are clearly circumscribed or some others diffusely infiltrating. Delineation may then or nor be easy depending simply on differences in “pathology”. Figure 4 illustrates how different (experienced) observers may derive different GTV contours based on the same document. When defining and reporting a GTV one need to specify: the tumour location and extent according to the AJCC and UICC TNM cancer-staging systems [6, 41] and the WHO International Code for Disease in Oncology (ICD-O) [36].

2.1.2 Variation with imaging technique or approach

The methods used to delineate the GTV have to be specified and reported because different examination methods may come out with different results (see Figures 5 and 6). For three-dimensional conformal radiation therapy and IMRT, until recently, anatomic imaging using CT and MRI scans were typically the most commonly used techniques to define the extent of the GTV, in addition to clinical examination. More recently introduced, PET-CT is able to add a functional dimension in the evaluation of the GTV (see Section 2.1.3) with a high clinical impact on diagnosis, staging and/or restaging of many malignancies.

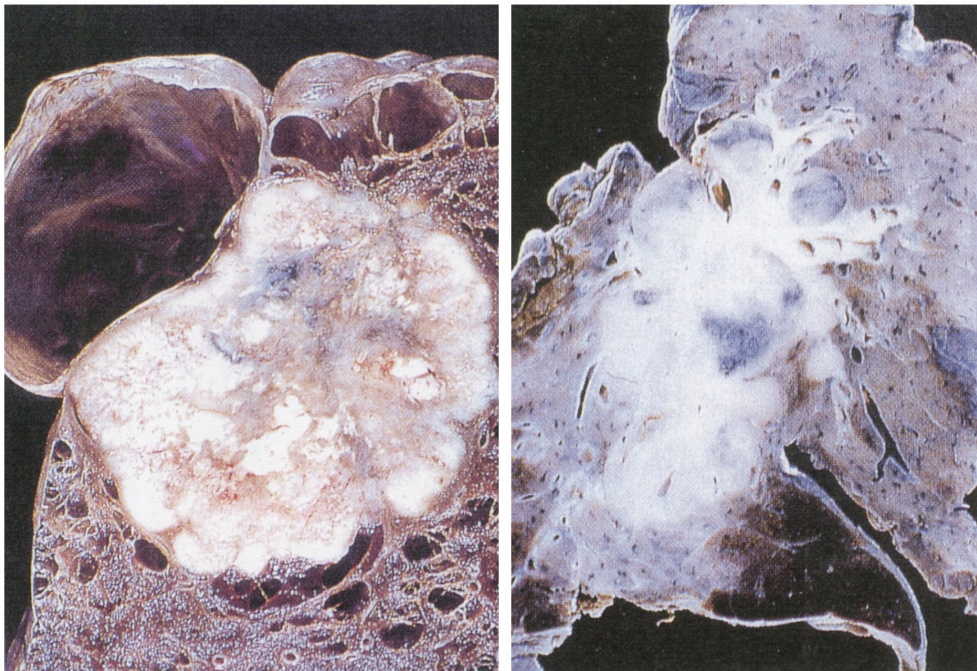


Figure 2: Example of two different macroscopic growth patterns for lung tumours. To the left a large-cell carcinoma, arising in the periphery of the lung. The tumour is well circumscribed. To the right a case of small-cell anaplastic lung cancer (SCLC), with an irregular tumour and invasion along the bronchial tree. From Dana-Farber Cancer Institute, Atlas of Diagnostic Oncology, T. Skarin M.D. (Ed.) [29].

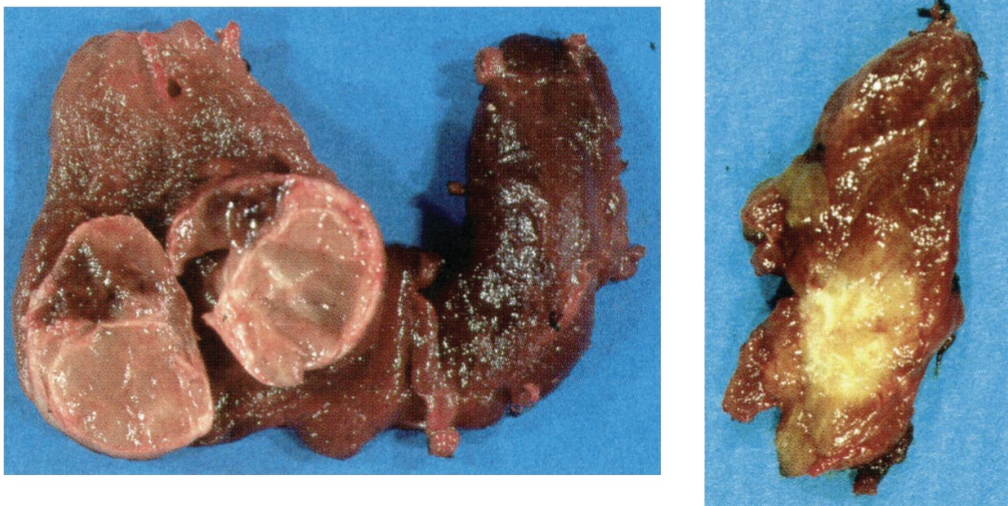


Figure 3: Example of two different macroscopic growth patterns for thyroid carcinomas. To the left is a differentiated follicular carcinoma. The tumour is sharply circumscribed and surrounded by a distinct fibrous capsule. To the right is a differentiated papillary carcinoma. The tumour is unencapsulated, irregularly outlined and infiltrates diffusely into the surrounding thyroid parenchyma. Courtesy Otto Ljungberg [30].

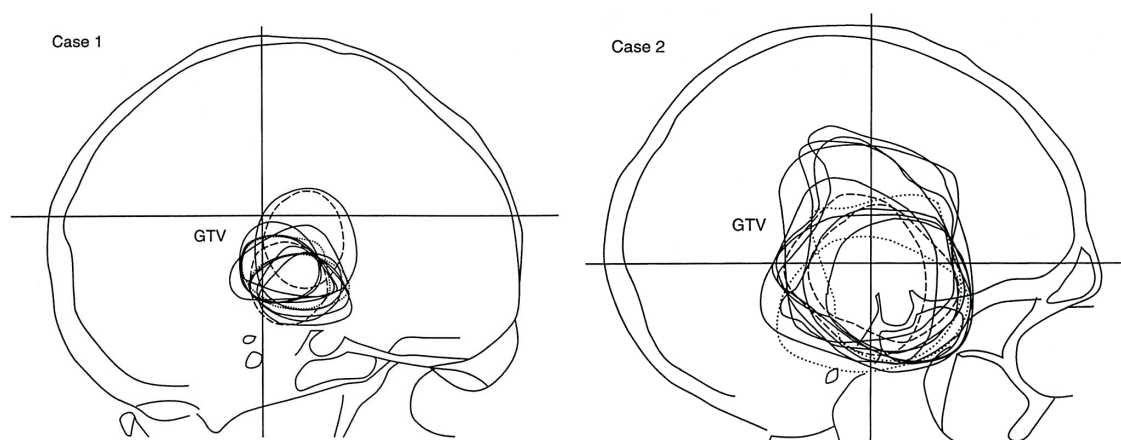


Figure 4: Schematic drawings on lateral radiographs for two patients with brain tumours, where the gross tumour volume was delineated by: eight radiation oncologists (—), two radiodiagnosticians (···), and two neurosurgeons (- - -). Adapted from Leunens et al. [29].

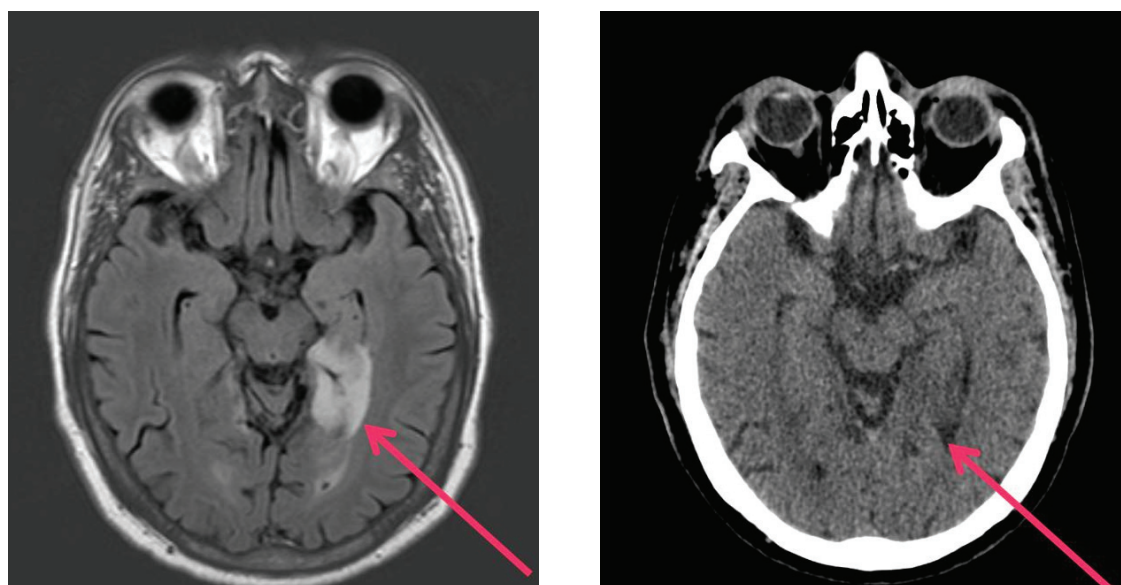


Figure 5: Low grade glioma located at the left internal deep temporal region (see arrows). Clinically the initial symptom was an epileptic fit and no biopsy has been performed. The lesion is larger and can be more clearly delineated on the MRI section. To the left a hypersignal clearly seen at the MRI-FLAIR (FLuid Attenuated Inversion Recovery). To the right a CT section without contrast-enhancing medium. Courtesy: L. Renard, Saint-Luc University Clinics, Brussels, Belgium.

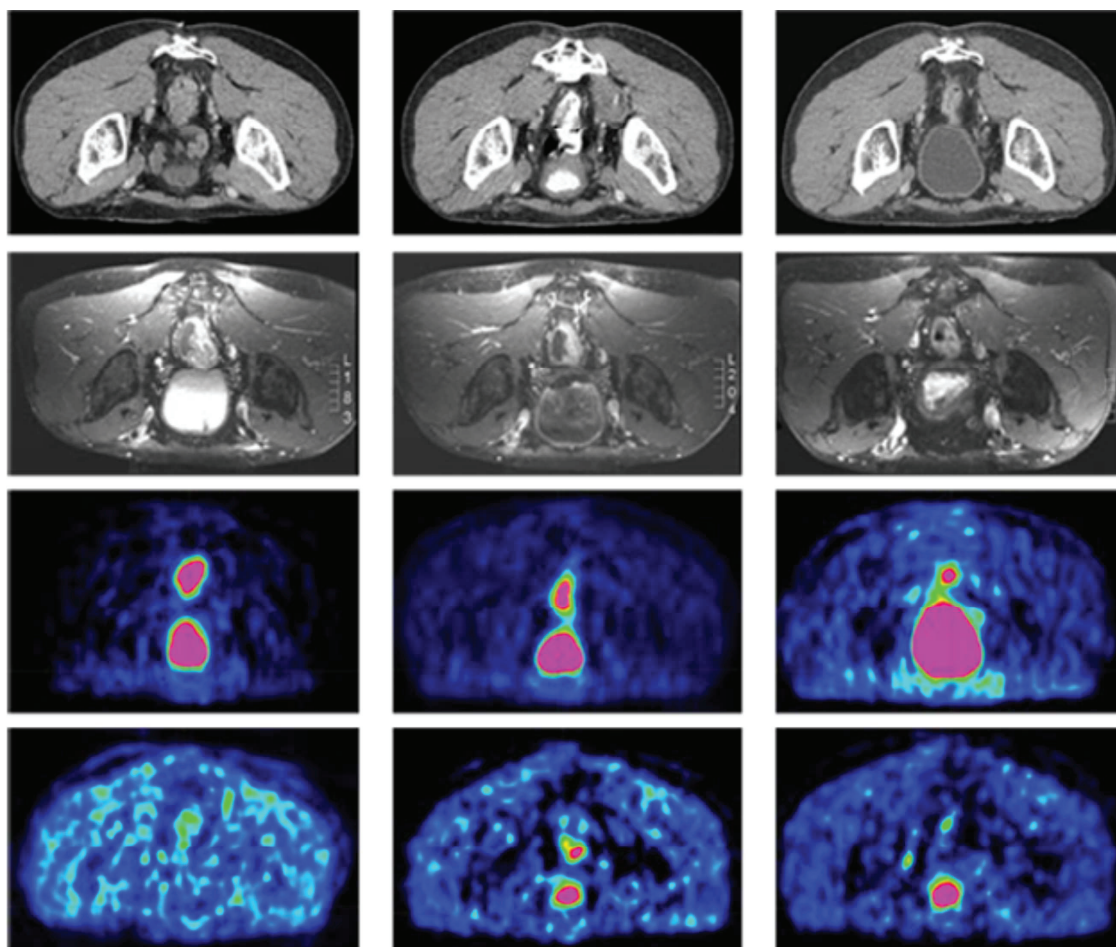


Figure 6: Comparison between various modalities for the definition of the primary rectal tumor GTV before, during concomitant chemo-radiotherapy (19 Gy) and after therapy (46 Gy). PET-CT acquisitions were performed in a prone position using a belly board; MRI acquisitions were performed in supine position.

Courtesy of Prof. K. Haustermans, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium [32].

Left column: GTV delineated prior any treatment.

First row: primary-tumour GTV delineated with a contrast-enhanced CT: GTV-T (CT, 0 Gy).

Second row: primary-tumour GTV delineated with a fat-saturated T1-weighted turbo spin-echo MRI: GTV-T (MRI T1, fat sat, 0 Gy).

Third row: primary-tumour GTV delineated with a FDG-PET: GTV-T (F-Miso-PET, 0 Gy).

Fourth row: primary-tumour GTV delineated with a F-Misonidazole PET: GTV-T (F-Miso-PET, 0 Gy).

Middle column: GTV delineated during treatment (average absorbed dose 19 Gy).

First row: primary-tumour GTV delineated with a contrast-enhanced CT: GTV-T (CT, 19 Gy).

Second row: primary-tumour GTV delineated with a fat-saturated T1-weighted turbo spin-echo MRI: GTV-T (MRI T1, fat sat, 19 Gy).

Third row: primary-tumour GTV delineated with a FDG-PET: GTV-T (F-Miso-PET, 19 Gy).

Fourth row: primary-tumour GTV delineated with a F-Misonidazole PET: GTV-T (F-Miso-PET, 19 Gy).

Right column: GTV evaluated 27 days after treatment.

First row: primary-tumour GTV delineated with a contrast-enhanced CT: GTV-T (CT, 46 Gy).

Second row: primary-tumour GTV delineated with a fat-saturated T1-weighted turbo spin-echo MRI: GTV-T (MRI T1, fat sat, 46 Gy).

Third row: primary-tumour GTV delineated with a FDG-PET: GTV-T (F-Miso-PET, 46 Gy).

Fourth row: primary-tumour GTV delineated with a F-Misonidazole PET: GTV-T (F-Miso-PET, 46 Gy).

If different methods for the definition of the GTV are used which provide complementary information, the radiation oncologist may have to define a “composite” GTV. This composite GTV (GTV_{compplan}) is the GTV that will be ultimately adopted for the oncological part of the treatment planning. Moreover the radiation oncologist must be aware of the limits of spatial resolution inherent to each technique that generates inaccuracy in delineation and multi-modal image fusion. For example, for the treatment of cervix carcinoma, information provided by CT, MRI, and eventually other techniques should be combined with clinical examination (performed if needed) under general anesthesia.

2.1.3 Identification of functional sub-GTV(s)

The use of functional imaging with positron emission tomography (PET) using various tracers or with functional magnetic resonance imaging (fMRI) can add a functional aspect to the delineation of the GTV, e. g. metabolic status, hypoxia, cellular proliferation that are likely to impact on the treatment outcome (see Table 1) [11, 17]. From a therapeutic point of view, functional information can be used to define sub-GTVs that should receive some additional dose [23]. It is thus important that the method used to evaluate the size and shape of the GTV be specified as different clinical and imaging methods may result in different delineated GTVs.

2.1.4 Variation of GTV during treatment

The dimensions and shape of the GTV change during treatment. These changes may be quantified with anatomic and/or functional imaging techniques, allowing the definition of a modified GTV that might be used to adjust the dose distribution [7, 8]. It is therefore recommended to specify the dose already delivered and/or the time when the GTV is evaluated or measured with respect to the start of treatment. Because delineation of a GTV may vary according to the diagnostic modality (e. g. clinical examination, anatomic imaging, functional imaging) and as a result of the treatment, a clear annotation is required. For example:

- GTV-T (clinical, 0 Gy): tumour GTV evaluated clinically before the start of the radiotherapy;
- GTV-T (MRI-T2, 30 Gy): tumour GTV evaluated with a T2-weighted MRI scan after a dose of 30 Gy of external beam irradiation.

This approach avoids the introduction of new or potentially confusing terminology, e. g. biological target volume, proliferative target volume, hypoxic target volume, and is able to cover all the different situations that might be encountered.

As the GTV changes with treatment, i. e. “tumour shrinkage”, different successive GTVs have to be assessed: GTV_1 , GTV_2 , etc. For example if external beam therapy is combined, or not, with simultaneous chemotherapy, the GTV should be evaluated at the successive stages of the treatment: GTV_{diag} , $GTV_{20\text{Gy}/2\text{cycPlat}}$, $GTV_{45\text{Gy}/5\text{cycPlat}}$ or $GTV_{45\text{Gy}}$. In addition to volume regression, special emphasis should be given to the changes in the various tumour characteristics: signal intensity (MRI), standardised uptake value (PET-CT), configuration and topographic relations of the GTV to adjacent structures [5, 21, 44, 45].

Molecular uptake mechanism	Tracer	Isotope	Organs of highest physiological uptake ^a
amino acid transport and protein synthesis	Methionine	C-11	liver, salivary glands, lachrymal glands, bone marrow, pancreas, bowels, renal cortical, urinary bladder
	Fluoroethyltyrosine	F-18	pancreas, kidneys, liver, heart, brain, colon, muscle
	FDOPA	F-18	pancreas, liver, duodenum, kidneys, gallbladder, biliary duct
glucose metabolism	FDG	F-18	brain, myocardium, breast, liver, spleen stomach, intestine, kidney, urinary bladder, skeletal muscle, lymphatic tissue, bone marrow, salivary glands, thymus, uterus, ovaries, testicle, brown fat
proliferation	FLT	F-18	bone marrow, intestine, kidneys, urinary bladder, liver
hypoxia	FMISO	F-18	liver, urinary excretion
	FAZA	F-18	kidneys, gallbladder, liver, colon
	Cu-ATSM	Cu-64	liver, kidneys, spleen, gallbladder ^b
lipid metabolism	Choline	C-11	liver, pancreas, spleen, salivary glands, lachrymal glands, renal excretion, bone marrow, intestine
	Fluoroethylcholine	F-18	liver, kidneys, salivary glands, urinary bladder, bone marrow, spleen
	Acetate	C-11	gastrointestinal tract, prostate, bone marrow, kidneys, liver, spleen, pancreas
angiogenesis/integrin binding	Galacto-RGD	F-18	bladder, kidneys, spleen, liver
SSTR binding	AH111585	F-18	bladder, liver, intestine, kidneys
	DOTATOC	Ga-68	pituitary and adrenal glands, pancreas, spleen, urinary bladder, liver, thyroid
	DOTATATE	Ga-68	spleen, urinary bladder, liver

^a Uptake ranking is from higher to lower organ activity concentration.

^b Estimated from calculations using ⁶⁰Cu-ATSM-PET.

Table 1: Tracers for image-guided radiotherapy using positron emission tomography. ¹¹C has a half-life of 20 minutes, ¹⁸F has a half-life of 118 minutes, ⁶⁴Cu has a half-life of 12.7 hours, and ⁶⁸Ga has a half-life of 67.7 minutes [11, 17].

2.2 Clinical target volume (CTV)

2.2.1 Definition

The *clinical target volume (CTV)* is a volume of tissue that contains a demonstrable GTV and/or subclinical malignant disease at a certain probability considered relevant for therapy (see Figure 7). There is no general consensus on what probability is considered relevant for therapy, but typically a probability of occult disease higher than 5 % to 10 % is assumed to require treatment. This remains

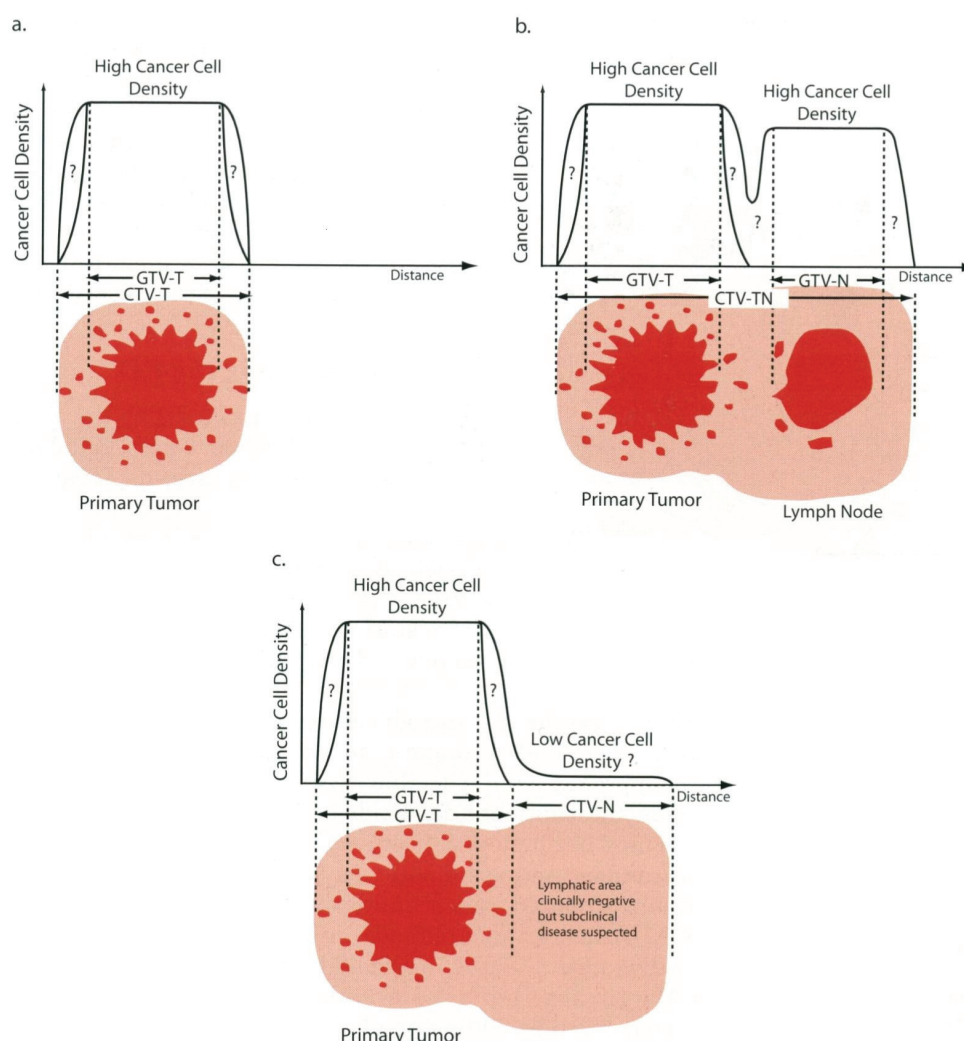


Figure 7: Schematic illustration of the relations between GTV(s) and CTV(s) in different clinical situations [30].

- (a) Simple case with one GTV and the corresponding CTV, e. g. skin tumour. At the level of the GTV (dark red), the cellular density is the highest (as an average, about 10^6 cells/mm³), but may be heterogeneous, e. g. due to necrosis. The width of the safety margin (light red) is selected so that, in principle, no cancer cells are present outside the limits of the CTV. The cancer cell density decreases between the border of the GTV and the outside limits of the CTV, but the variation of the cell density with distance is not known (“?” in the figure) and depends on tumour type and location. In some situations a natural anatomical border may limit subclinical extension, e. g. parietal, pleura in mediastinal lymphoma.
- (b) Two GTVs are present: the primary tumour, GTV-T, and a metastatic fixed lymph node, GTV-N, e. g. a tumour of the tonsil with a homolateral cervical lymph node. A safety margin for microscopic invasion has to be taken around each GTV, which may lead to the definition of two CTVs: CTV-T corresponding to the primary tumour and its safety margin, and CTV-N for the lymph node and its safety margin. Actually, since in this example, the two CTVs are close to each other and because there are certainly malignant cells between the two CTVs, only a single CTV is selected (CTV-TN), which includes the two GTVs and a common safety margin.
- (c) The primary tumour and its safety margin define a first CTV (CTV-T). In addition, there is a high probability of invasion of the adjacent lymph node area, which leads to the definition of a second CTV (CTV-N). It is decided to keep the two CTVs adjacent to each other as there could be cancer cells all along between them, e. g. breast cancer and adjacent lymph node area(s), or tumour of the head and neck and adjacent lymph node area(s).

a clinical judgement where the type of malignancy, the side-effects of CTV irradiation, the consequences of failure, and the expected feasibility of salvage treatment need to be considered. The notion of subclinical malignant disease takes into account the microscopic tumour spread at the boundary of the primary tumour GTV (thus outside of what can be observed, palpated, or visualised on a particular imaging modality), the possible regional infiltration into lymph nodes, and the potential metastatic involvement of other organs (e. g. brain), despite their normal appearance on clinical and radiological examinations. There is no CTV associated with a benign tumour GTV since there is no risk of microscopic or metastatic tumour infiltration or dissemination into the regional nodes.

2.2.2 Delineation of the CTV

The CTV concept may be very different between highly malignant (aggressive) and mildly (moderately) infiltrating tumours (e. g. meningioma). The selection of the tissues that bear risk for microscopic infiltration outside of the GTV is a probabilistic assessment integrating the biological and clinical behaviour of the various tumour entities, and the knowledge of the surrounding anatomy, including structures that are barriers to tissue infiltration (e. g. muscular fascia, bone cortex), or on the contrary, by structures that are easy conduits for tumour dissemination (e. g. fatty space) as shown in Figure 8. Different tumours can exhibit a variety of spread patterns. For instance, the vast majority of sarcomas do not bear risk of lymph-node infiltration, and thus the post-operative CTV will typically include only the post-operative tumour bed using the principle of “fascia containment” [35]. In head and neck squamous-cell carcinoma, the probability of pathologic lymph node involvement has been well described, and the distribution follows a predictable pattern allowing clinicians to tailor the CTV

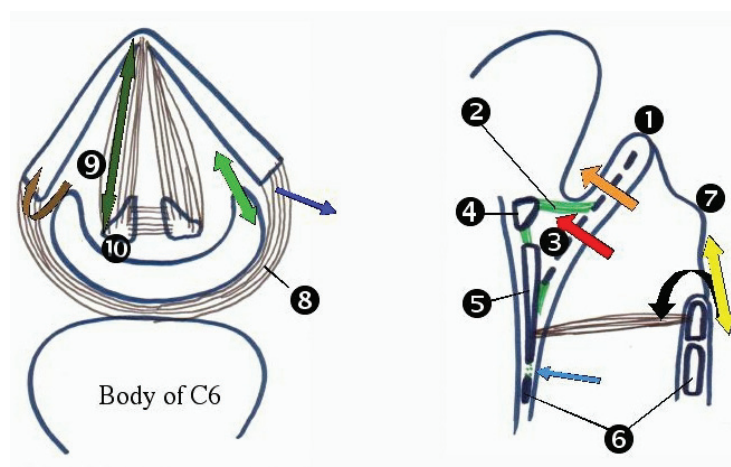


Figure 8: Schematic view of laryngeal/hypopharyngeal tumour infiltration [13]. Axial view at the level of the vocal cord (left panel) and mid-sagittal view of the pharyngo-larynx (right panel). Tumours of the supra-glottis larynx easily infiltrate the pre-epiglottic space (3) through the infra-hyoid epiglottis (1) (red arrow). The hyo (4) epiglottis membrane (2) prevent tumour infiltration to the valleculae. Tumours of the supra-hyoid epiglottis easily infiltrate the valleculae through the epiglottis (orange arrow). Glottic tumours can infiltrate the thyroid cartilage (5) and the arytenoid cartilage (10) at the insertion of the vocal muscle (dark green arrow). Anteriorly, glottic tumours can invade the anterior commissure, and from there infiltrate outside of the laryngeal box through the crico (6) thyroid membrane (light blue arrow). Tumours of the hypopharynx can directly invade the para-glottic space (9) (light green arrow), the thyroid cartilage (5) (brown arrow), the parapharyngeal space through the constrictor muscle (8) (dark blue arrow), and the endo-larynx through the ary-epiglottic fold (7) (black arrow).

to the primary tumour location and extent [12]. Similar observations have been reported for other tumour types and sites as well, e. g. for rectal tumour as listed in Table 2 [32].

At the primary tumour site, the selection of CTV should be guided by the general principle that the microscopic spread of tumour cells follows anatomical compartments (e. g. para-laryngeal, parapharyngeal, pre-epiglottic spaces in the head and neck area) bounded by anatomical barriers (e. g. bone cortex, muscular fascia, ligaments). Unless transgressed, such barriers would limit the local primary tumour spread. Over the last few years, recommendations for CTV selection have been proposed for various primary tumour sites, see review in [13].

Delineation of the CTV is an important part of the treatment prescription which implies the responsibility of the radiation oncologist in charge of the patient. It is currently based on clinical experience of the individual physician and also on the experience accumulated in the department. Together with the selection of the absorbed dose expressed in terms of the DVH and/or the dose to selected reference points. For quantitative margin definition and future research, it would be advantageous to introduce a probabilistic definition, e. g. to choose the CTV based on a defined probability of containing clonogenic cells that need to be treated.

The three-dimensional delineation of the CTV for both the primary tumour or nodal site should be guided by published recommendations, which aim to translate the regions at risk for microscopic dissemination (both around the primary tumour and at lymph node areas) into boundaries easily identifiable on planning CT or MRI, see reviews in [13]. By definition, each malignant tumour GTV should be associated with a CTV. However, several contiguous GTVs could be associated with a common CTV. A typical example is multiple contiguous metastatic nodes at levels II and III in the neck, which will be associated within a single CTV covering the whole of levels II and III. Similarly, when sub-GTVs are delineated, for example, by a GTV-T (F-Miso-PET) to detect hypoxia, the whole anatomic GTV, for example, a GTV-T (CT), is typically surrounded by a common CTV.

When several CTVs are used, it is recommended to use an unambiguous terminology corresponding to the GTV. This is especially true for ion-beam therapy when ion beams are used as a boost after a

T-N stage	Organ or site of adherence or invasion	Tumour or tumour-bed volumes	Nodal volumes
T1-3N1-2	not applicable	rectum/rectal bed ^a	internal iliac, pre-sacral
T4N0	anterior or posterior	rectum/rectal bed plus organ/structure involved	internal iliac, pre-sacral; optional: external/common iliac if anterior adherence
T4N1-2 (anterior adherence or invasion)	prostate, bladder, uterus, vagina (proximal 2/3) ^b	rectum/rectal bed plus organ/structure involved	internal iliac, pre-sacral, external/common iliac ^b
T4N1-2 (posterior/lateral adherence or invasion)	presacrum or pelvic side-walls	rectum/rectal bed plus organ/structure involved	internal iliac, pre-sacral

^a Primary tumour plus from 3 cm to 5 cm margin.

^b Inguinal nodes should be included if distal vagina or anus is involved by direct extension of primary or recurrent tumour.

Table 2: Selection of the CTV for rectal carcinoma according to T-N stage. Redrawn from Gunderson in [10].

larger CTV treated with photons. For example:

- CTV-T (0 Gy) corresponds to the CTV including the primary tumour GTV and assumed regions of infiltration around the GTV-T as defined before the start of the treatment;
- CTV-T+N (MRI-T2, 30 Gy) corresponds to the CTV for the primary tumour and regional nodes evaluated with a T2-weighted MRI scan after a dose of 30 Gy.

It should be remembered that the CTV does not describe the range of motion of internal anatomy. Knowledge about the CTV motion (and all other geometrical uncertainties) must be taken into account in the PTV delineation (see Section 3.1).

2.2.3 Risk related CTVs

The probability of presence of malignant cells and their density in the safety margin around the GTV decreases with the distance from the border of the GTV. The malignant cell density is the highest at the border of the GTV and is expected to decrease (in principle) down to close to zero at the external border of the CTV, i. e. external border of the safety margin. Therefore, and because of the related risk of recurrence, the concept of risk related CTVs has been introduced, e.g. as high-risk or low-risk CTV with varying safety margins and/or various topographic sites. One practical consequence is that different dose levels may be prescribed to such risk related CTVs. Such concepts have been found particularly useful in head and neck and cervix cancer therapy [32]. Along the same line, some authors have identified high-, intermediate- and low-risk CTVs. The assessment of risk may be even related to the response to treatment, which is part of the following paragraph on adaptive treatment [16].

2.2.4 Adaptive concept for CTV assessment

As indicated in Section 2.1.4 it is well documented that the GTV – as can be observed with different clinical investigations and imaging techniques – changes or is shrinking during the course of (as a result of) the treatment. It is thus important, when reporting the dimensions and shape on the GTV to specify the delivered dose or the time the GTV volume/extent is delineated. In contrast, the CTV is a “subclinical” concept, based on the probability of cancer cell invasion. As a consequence by definition the CTV cannot be detected clinically (palpation) or by any “macroscopic” imaging technique, e. g. CT, MRI, etc. However, the CTV is related to a GTV. Any (rate of) regression of the GTV during treatment may influence the (medical decision concerning) delineation of the corresponding CTV, e. g. thickness of the safety margin. In addition, during the treatment course with the regression of the GTV and/or patient loss of weight, the anatomical structures (muscles and others) may be altered requiring a new delineation of the CTV.

2.3 Organ at risk (OAR)

The *organ at risk (OAR)* or critical normal structures are tissues, which if irradiated could suffer significant morbidity, and thus might influence the treatment planning and/or the dose prescription [32]. In principle, all non-target tissues could be organs at risk. However, normal tissues considered as OARs typically depend on the location of the CTV and/or the prescribed dose. For example, in the post-operative irradiation of a lower limb soft-tissue sarcoma, the muscles that are not included in the compartment at risk for microscopic infiltration are considered as OARs, and thus will influence the

beam delivery. Fibrosis and oedema induced by dose to these muscles might indeed have a major impact on the treatment morbidity. The criteria for defining and prescribing absorbed-dose limitations in the OAR will evolve with time and development of treatment techniques.

From a functional point of view, tissue organisation has been conceptually divided into “serial”, “parallel” or “serial-parallel” [27, 48]. Serial organs, or serial-like organs, (e. g. spinal cord, nerve, gastrointestinal tract) consist of a chain of functional units, which all need to be preserved to guarantee the functionality of the tissue. For instance, in the spinal cord, destruction of a specific nerve bundle will affect all nerve functions downstream from the level of injury. Parallel organs, or parallel-like organs (e. g. lung, parotid), consist of functional units acting independently of each other. For instance, in the lung, destruction of a limited number of alveolar structures will not greatly affect the overall organ function. Breathing capacity will be significantly impaired only when a threshold lung volume has been destroyed. Some organs such as the kidney have a mixed serial and parallel organisation. The glomerulus has a more parallel organisation, whereas the distal tubules are more serially organised. The concept of tissue organisation is operationally useful for determining dose-volume constraints and for the evaluation of the dose-volume histograms. Indeed, for serial-like organs showing a threshold-binary response, the dose at or close to the maximum dose to a given volume is typically the best predictor of loss of function. In contrast, for parallel-like organs showing graded dose responses, the mean dose or the volume that receives a dose in excess of some defined value have been used as predictors of loss of function. This concept of tissue organisation is also useful for the delineation of OARs. For instance, for the retina or tubular-type organs such as the rectum, it is preferred (but more time consuming) to delineate the wall or surface rather than the full organ. For serial-like organs, as the volume irradiated may have less impact on the assessment of the organ tolerance, the extent to which these organs are delineated will probably have a lesser importance for the patient’s treatment. However, to allow comparison between centres, it is very useful to follow guidelines, e. g. to delineate the spinal cord for head and neck tumours from its junction with the brain stem to the first dorsal vertebra, and for prostate cancer to delineate the rectum starting at the anus up to the position at which the rectum turns horizontally into the sigmoid colon. In contrast, for parallel-like organs, the volume assessment is crucial, and complete organ delineation is required, see Figure 9. In all instances the volume of the organ delineated should be recorded.

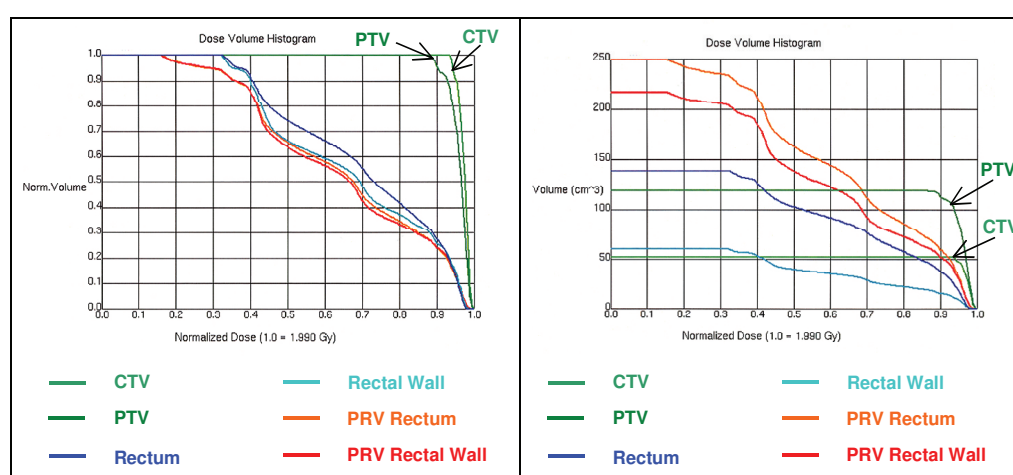


Figure 9: Relative (left) and absolute (right) cumulative dose volume histograms for a prostate cancer case. The DVH for the rectum and rectal wall are different, although the difference is minimal for their respective PRVs. The margin on the PRV was 0.5 cm as was the margin between the PTV and CTV.

3 Radiation-oncology concepts

3.1 Planning target volume (PTV)

3.1.1 From CTV to PTV

In the previous sections, *pure oncological concepts* were considered that are independent from the irradiation modality. The present section deals with *radiation-oncology concepts* implying the influence of the radiation therapy technique. The goal of the radiation treatment is to deliver the appropriate (and/or prescribed) dose to all parts of the CTV(s), with a clinically acceptable probability. To achieve this goal, the volume called *planning target volume (PTV)* is planned to be irradiated. This implies, in general, irradiation (at the prescribed dose level) of some normal tissues, in addition to the CTV. Depending on the tumour location, tumour type, and treatment technique this additional normal tissue volume may be large or limited. The concept of planning target volume was introduced in the ICRU Report 50 [27] and developed in the successive reports [29–32].

3.1.2 Internal margin (internal target volume, ITV)

In ICRU Report 62, the internal target volume (ITV) was defined as the CTV plus a margin which takes into account uncertainties in size and shape of the CTV and its position/movements within the patient [29]. These uncertainties result essentially from expected physiological movements (respiration) and variations in site, size, shape, and position of organs or tissues contained in or adjacent to the CTV (different filling of the bladder or rectum, swallowing, heart beat, movements of the bowel, etc.). The resulting additional normal tissues that need to be irradiated constitute the *internal margin* as opposed to the *set-up margin* that is considered in the next section [1, 20].

3.1.3 Set-up margin (external)

To account specifically for uncertainties (inaccuracies and lack of reproducibility) in patient positioning and alignment of the therapeutic beams during treatment planning and through all treatment sessions, an additional volume of normal tissue may need to be irradiated. For that aim, the term of *set-up margin* has been introduced [29]. Its size and shape depend to a large extent on the irradiation technique. These uncertainties could depend on patient day-to-day set-up. For some tumour locations, they can be reduced by special techniques (e. g. plastic shell for head and neck tumours contention, tumour tracking for respiration) but in general they cannot be totally controlled. They are very small in some cases (e. g. for brain tumours) in case of rigid (invasive) fixation systems.

In ICRU Report 62 [29], it was recommended that internal and external margins be added quadratically, but often in practice they are instead added linearly which could lead to an unacceptably large margin. The ITV concept may be useful mainly in clinical situations where uncertainty about the position or movement of the CTV dominates over set-up uncertainties and/or when they are independent.

3.1.4 Definition and characteristics of the PTV

The *planning target volume* is a geometrical concept introduced for treatment planning and evaluation. It is the recommended tool to shape dose distributions to ensure that the prescribed dose will

actually be delivered to all parts of the CTV, with a clinically acceptable probability, despite geometrical uncertainties such as organ motion and set-up variations. It is used for dose prescription and reporting [32]. Unlike the volume concepts GTV and CTV mentioned in Section 2 that are mainly based on clinical situations and oncological principles, the PTV depends, in addition and to a large extent, on the treatment conditions and technical possibilities.

The dose to the PTV can be expressed by the dose-volume histogram (DVH) or/and the dose at one (several) fixed reference point(s)/volumes in the PTV. The PTV is defined with a fixed position in relation to the patient coordinate system or to a coordinate system related to the GTV/CTV/radiation application system, e. g. for some techniques in brachytherapy. The dose prescription to the PTV(s) is aiming at delivering the appropriate dose to all parts of the CTV which is the ultimate goal of the treatment (radical, postoperative or palliative treatment). The description of the PTV is thus an important part of the patient medical record. Like dose prescription and delineation of the GTV(s) and CTV(s), dose prescription and delineation the PTV(s) is the responsibility of the radiation oncologist in charge of the patient, in close cooperation with the medical physicist. Prescription (aim) is forwarded to the medical-physics team and the radiotherapist team to be applied. The final prescription may be only reached (in complex treatment planning procedures) during the process of treatment planning itself (IMRT, IGRT), taking into account various constrains for TPV(s) and (various) OARs.

In modern radiation therapy and for complex treatments several CTVs are often defined to which different dose levels are prescribed. For example the treatment starts with the definition of a (large) CTV (i. e. CTV1). A corresponding (large) PTV is defined (i. e. PTV1) where the dose is prescribed to ensure that the whole CTV1 receives the appropriate dose (of course within safety limits for the normal tissues). A second CTV (i. e. CTV2) may then be defined to which a higher dose is prescribed. A second PTV (i. e. PTV2) is thus planned where a higher dose is prescribed. The second CTV (CTV2) could be in some cases be equal to the volume initially occupied by the GTV, see Table 3. In some complex treatments more than two CTVs (and thus PTVs) may be identified. For example, first GTV + full CTV margins, then GTV + high risk CTV margins, and finally only the GTV. Irradiations may be done successively or simultaneously. In any situation delineation of the PTV is always limited by the normal tissue tolerance.

Scenario 1	
One GTV, one CTV, the margins and one PTV are delineated.	
$(\text{GTV} +)^* \text{CTV}$	$+ (\text{int/set-up})^{**} \Rightarrow \text{PTV}$
Scenario 2	
The “high risk” CTV is planned to receive a higher dose: two PTVs are delineated.	
$(\text{GTV} +) \text{CTV}$	$+ (\text{int/set-up}) \Rightarrow \text{PTV1}$
$(\text{GTV} +) \text{CTV-high risk}^*$	$+ (\text{int/set-up})^{**} \Rightarrow \text{PTV2}$
Scenario 3	
A “boost” is delivered to the volume initially occupied by the GTV.	
$(\text{GTV} +) \text{CTV}$	$+ (\text{int/set-up}) \Rightarrow \text{PTV1}$
$\text{GTV}(\text{CTV})^\dagger$	$+ (\text{int/set-up}) \Rightarrow \text{PTV2}$
* (GTV +) is added to remind that the GTV is, by definition, included in the CTV	
** combination of internal and set-up margins (see definitions in text)	
† because of GTV shrinkage, part of the initial GTV is now “CTV”	

Table 3: Examples of the application of the PTV concept in different scenarios.

When different irradiation techniques are evaluated, the doses to different PTVs can be compared and added only at the condition that the appropriate biological weighting factors are applied for differences in isoeffectiveness of the techniques applied. In addition, all PTVs have to be geometrically related (directly or indirectly) to the same coordinate system. Application of the PTV concept for different irradiation modalities is given in Section 3.1.5.

In summary, the PTV is the volume planned to be irradiated in order to ensure that all parts of the CTV receive the appropriate dose with the clinically accepted probability and within the constraints of the OARs. There is thus a PTV each time a treatment is planned for curative, postoperative or palliative intent. However, depending on the technique the approach to delineate the PTV, its size and shape may be very different. In addition, depending on the global treatment strategy there can be more than one PTV.

3.1.5 The PTV for different irradiation modalities

External photon-beam therapy In external photon-beam therapy, the PTV usually surrounds the representation of the CTV with a margin such that the planned dose is delivered to the CTV (this margin is a kind of “shell” surrounding the CTV). The thickness of this margin takes into account both the internal and the set-up uncertainties. The internal margin may be very narrow (e. g. brain tumours) or large (e. g. some lung or abdominal tumours).

The set-up uncertainties depend on different types of factors such as:

- variations in patient positioning;
- mechanical uncertainties of the equipment, e. g. sagging of gantry, collimators and couch;
- dosimetric uncertainties;
- transfer set-up errors from CT and simulator to the treatment unit;
- human factors.

The relative importance of these factors depends on the photon technique used. The set-up margin may be very small in particular with on-line correction for the different set-up errors and variations. The thickness of the margin may vary with orientation and could be defined in any number of directions. However, most treatment planning systems only allow margins to be defined differently in each of the three Cartesian dimensions. In some clinical situations (e. g. breast cancer, head and neck cancer), the PTV extends close to or even outside the patient’s skin because of invasion of tumour or because of the application of a margin. Most dose-computation algorithms cannot accurately compute dose in build-up regions, which will lead to convergence errors when such algorithms are used in optimisation [18].

Electron-beam therapy For electron-beam therapy the delineation of the PTV raises the same issues than for proton.

Interstitial, intracavitary, and intraluminal brachytherapy Depending on the brachytherapy techniques, the volume of the PTV may be close or even the same as the volume occupied by the CTV. This issue is discussed in the ICRU Report in preparation. Due to the physics characteristics of brachytherapy, the design of a shell around the CTV after applicator insertion as a margin to account for uncertainties seems not to be appropriate. Such “shell margin” results in dose escalation within the

GTV/CTV. The compensation for uncertainties has to be integrated into the application planning procedure which implies that source positions have to be pre-planned before the application which may have to be loaded during the definitive planning after the application to account for uncertainties and to ensure the dose to be appropriately applied to the CTV. Finally, fundamental differences related to the margins have to be taken into account depending on the direction of the sources. On the one hand along the longitudinal direction of the radiation sources, (pre-planning) margins seem to be applicable without resulting in major change of the dose within the GTV/CTV. In contrast, such margins are critical in the orthogonal direction, as they result in dose escalation throughout the GTV/CTV, except if a specific application technique is applied [39, 42].

Proton and carbon-ion beam therapy Delineation of the PTV needs a specific approach for proton and carbon-ion-beam therapy. This issue had been discussed in depth in ICRU Report 78 [31] and is summarised here. For any type of patient immobilisation, patient and organ localisation technique, there is always some degree of residual motion and uncertainty about the location of patient, CTVs, and OARs. These uncertainties must be taken into account in planning the treatment. When a single beam is used, the beam sizes may be enlarged to cover set-up uncertainties and energy is increased to compensate for uncertainties in beam penetration. Besides the CTV, these two additional irradiated volumes of normal tissues define the PTV. An example of this approach is given in ICRU Report 78 on page 171 [31]. When two (or more, non-parallel opposed) beams are used, the PTVs for each beam have to be reported individually. It is difficult to add them because they correspond to different processes.

Margins at the periphery of the CTV or OARs – lateral margins: The first task is to add a lateral margin (or margins) to the beam in order to allow for uncertainties when defining a PTV (or PTVs) for the clinically determined CTVs and usually the PRVs for all delineated OARs.

Margins at the periphery of the CTV or OARs – margin in depth: For protons and carbon ions, a margin in depth between the treated volume (see Section 3.2) and the CTV must be provided to allow for uncertainties in beam penetration. The correct approach would be to assess the sources of uncertainty in the beam penetration, i. e. uncertainty concerning the precise location of skin surface and internal organs, effect of overlying heterogeneities, and computation algorithm. Then the compensator is designed so that the lower uncertainty bound of the treated volume just covers the CTV. Motions on internal organs transverse to the beam direction can, in addition to the possibility of causing under-dosing the CTV periphery, have a subtle influence on tissues distal to the moving organ or tumour. In the lung, for example, motion of a tumour transverse to the beam direction can affect the particle-beam penetration distal to the region of the tumour as changes in the shadowing of down-stream tissues by the tumour will affect the penetration of particles reaching those tissues.

Dose variation within the CTV and OARs – interplay effects: With uniform beams produced by scattering, the beam is essentially delivered statically and the dose internal to the target volume is, in practice, largely unaffected by organ motion or patient misregistration. The situation is different if the beam is applied dynamically as with scanned beams. When a scanned beam is applied, organ motion can cause both positive and negative fluctuations in the dose distribution due to what have been termed “interplay effects” [3, 37]. Interplay effects arise because both the beam delivery and the target of that delivery are changing with time. A cell within an organ might move synchronously with the beam while it is being scanned in some direction and, as a result, receive either more dose (when the movement is in the scan direction) or less dose (when the movement is in the direction opposite to the scan) than was intended [9]. The in-

terplay effect is not merely a theoretical problem as evidenced by a radiobiological experiment performed by Gueulette et al. [14] on intestinal crypt cell assay. With a scanning proton beam, movement of the small intestine in relation to movement of the pencil beam could result in regions of the intestine being significantly under irradiated or over irradiated. Without correction for organ motion, the use of scanning beams increases the probability of the interplay effect, where regions of higher or lower dose occur within the PTV [14, 19].

3.2 Treated volume (TV)

Because of the limitations of irradiation techniques, the volume receiving the prescribed dose may be different from the PTV; it may be larger (sometimes much larger) or smaller, and in general more simply shaped (less with IMRT or protons and ions than with conventional photon radiation therapy). This leads to the concept of *treated volume* [29]. The treated volume (TV) is the volume of tissue that receives at least the dose prescribed by the radiation oncologist (or team) in charge of the patient and considered as appropriate to achieve the goal of the treatment (tumour eradication or palliation) within the bounds of acceptable complications.

If the delivered dose is specified in terms of the DVH, the treated volume could be the volume enclosed by the $D_{98\%}$ isodose [31, 32]. For reporting, the dose value selected to define the treated volume can be quoted either relative to the prescribed dose or in absolute terms. The “prescribed dose” can be expressed in terms of (physical) absorbed dose, and/or when appropriate in terms of the biologically weighted doses, i. e. “isoeffective” doses that take into account several factors such as the dose per fraction, overall time, radiation quality, but also the biological system and effect. It is important to identify the shape, size, and position of the treated volume in relation to the PTV for several reasons. One reason is to evaluate causes for local recurrences (inside or outside the treated volume). Determination of this volume is useful in order to compare the conformality of different treatment modalities: it is recommended.

3.3 Reference volume

When comparing treatments delivered in a given centre or in different centres using the same or different treatment techniques, one criterion could be the volume included in a given isodose surface. The *reference volume* concept can also be used for the treatment prescription and adapted based on the technical feasibility encountered during the planning procedure. This volume is the reference volume. The dose level selected to define the reference volume could be, or not, the dose selected to define the treated volume. It must be clinically relevant and depends on the tumour type, site, stage, histological characteristics or other factors. In any case, the definition of the reference volume implies to specify the selected dose level. The concept of treated volume is thus a particular case of the concept of reference volume. For a given patient there is only one treated volume, but one may define several reference volumes depending on the type of comparison or study is performed.

The reference volume concept can also be used for the treatment prescription and adapted and optimised based on the constraints for the target and organs at risk as it has been proposed for image guided adapted brachytherapy in cervix cancer.

3.4 Planning organ at risk volume (PRV)

3.4.1 Definition

As is the case with the planning target volume, uncertainties and variations in the position of the organs at risk during treatment must be considered to avoid serious complications. For this reason, margins have to be added to the OARs to compensate for these uncertainties and variations, using similar principles as for the PTV. This leads, in analogy with the PTV, to the concept of *planning organ at risk volume (PRV)*. A margin around an organ at risk with a serial-like structure (e. g. spinal cord where the maximum dose to a small volume determines tolerance) is more clinically relevant than around organs at risk with parallel-like structure (e. g. liver, lung, parotid). For these organs with parallel-like structure, it is more important to delineate the whole organ, since tolerance depends more on the percent volume irradiated. For reporting, it is recommended that, as for the PTV, the PRV be described by including the size of the margins applied to the organ at risk in different directions. As for the PTV, several authors have proposed approaches to calculate the OAR-PRV margins on the basis of systematic and random uncertainties, see references in ICRU Report 83 [32].

3.4.2 Overlap between PRV and PTV

Delineation of the PTV and the PRV will often result in one or more overlap regions, see Figure 10. It is recommended that the margins not be compromised for the PTV or PRV even if overlaps occur. To ensure sufficient normal tissue sparing, priority rules in the planning system can be used, or the PTV or PRV can be subdivided into regions with different dose constraints. In any case, the dose should be reported in the full PTV and PRV.

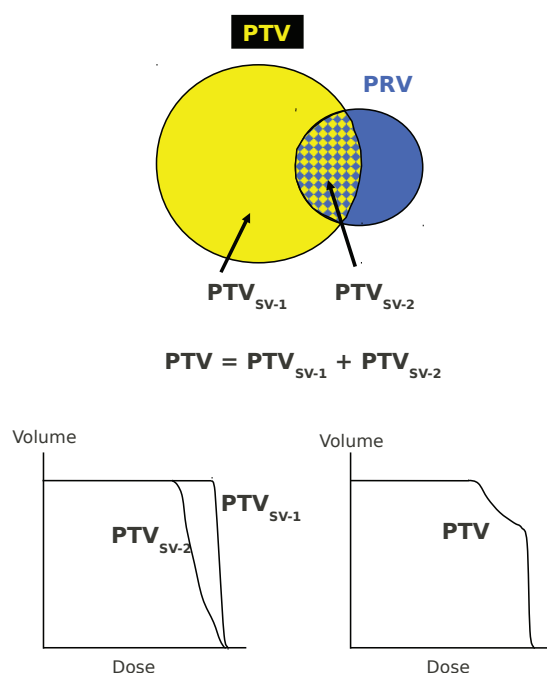


Figure 10: Schematic description of PTV subvolumes delineated in case of overlap between PTV and PRV [32]. This subvolume PTV can be used for planning purposes (beam arrangement and absorbed-dose prescription), but the absorbed dose should be reported for the whole PTV (right DVH). In the case of absorbed-dose compromise in the overlapping region between the PTV and the PRV, reporting the absorbed dose in the sub-PTV, PTV_{SV-1}, (left DVH) can incorrectly represent the absorbed dose to the underlying CTV [32].

3.5 Remaining volume at risk (RVR)

The volume that is firstly within the imaged region of the patient and secondly outside all delineated OARs and CTVs should be identified as the *remaining volume at risk (RVR)*. Doses to the RVR should be reported in addition to the doses to specifically-delineated volumes of interest (VOI) in order to ensure that attention is paid to all tissues, and not just a selected subset of them. For example, there could be unsuspected regions of high dose within the patient that would go undetected if the RVR were not explicitly evaluated. In addition, the dose to the RVR can be useful in estimating the risk of late effects such as carcinogenesis.

4 Radiobiological concepts in ion-beam therapy

4.1 From absorbed dose to biological effect and clinical outcome

Absorbed dose is a fundamental and rigorously defined quantity [4, 28]. Regardless of the type of radiation and biological system, the radiobiological and clinical effects are always related to the absorbed dose. National and international, i. e. BIPM, standards laboratories guaranty the accuracy and reproducibility of reference absorbed dose measurements. For therapeutic irradiations dosimetry protocols are regularly recommended and improved by medical physics associations or commissions (including ICRU). For radiation-oncology applications, the ICRU has always recommended that the (“physical”) absorbed dose(s) be reported at reference points and/or in relevant volumes, together with a complete description of the treatment conditions in order to allow full understanding, interpretation and reconstruction (if needed) of the treatment [29, 32].

As absorbed dose is a pure physical quantity, there is no need to imply any biological hypothesis or model. However, the relation between absorbed dose and biological effects is not unique but depends on several factors including absorbed dose rate (and instantaneous dose rate), dose range, dose per fraction, overall treatment time (and other time/dose factors), radiation quality (LET), dose homogeneity (dose-volume histogram, DVH), etc. Furthermore, the influence of these factors on the biological effects depends on the biological systems and effects considered, e. g. early or late effects on different types of tumours and normal tissues. Absorbed dose alone is thus not sufficient to predict the biological effects. Relative biological effectiveness (RBE) and isoeffective dose (D_{IsoE}) are important radiobiological concepts in ion-beam therapy that are dealt with in the following sections.

4.2 The relative biological effectiveness (RBE) concept

Radiation quality is defined by the type and energy spectrum of the ionising particles at the point of interest. Beam quality is defined by the depth-dose curve, penumbra, homogeneity and other (macroscopic) characteristics of the beam. It is well established that, at equal absorbed dose, different radiation qualities may produce different biological effects. To take this observation into account, the concept of *relative biological effectiveness (RBE)* has been introduced jointly by the ICRP and the ICRU [33] and defined again by the ICRU Report 30 [25].

4.2.1 Definition of RBE

When two (or more) different radiation qualities have to be compared one of them has to be selected as the reference, the other (ones) are the test radiation(s) under study. The RBE of a test radiation quality compared to the reference radiation quality is the ratio of the doses delivered with the reference radiation and the test radiation, respectively that are necessary to produce a given biological effect on a given system, all other conditions being the same:

$$\text{RBE}_{\text{test/ref}} = \frac{D_{\text{ref}}}{D_{\text{test}}}. \quad (1)$$

A reported RBE value is meaningful only to the extent that the *reference radiation quality, the biological system, effect, absorbed dose level, and irradiation conditions are specified*. A given RBE value is the result of an experiment or an observation: its validity is limited to the conditions under

which it has been determined. A RBE reported value (e. g. RBE equal 3 for ^{12}C relative to gamma ray of the ^{60}Co) is thus meaningful only to the extent that the biological system, effect, and irradiation conditions are specified.

4.2.2 Reference radiation quality

A RBE value can be determined for any couple of two radiation qualities, one of them being taken as the reference. However in order to facilitate exchange of information and reduce the risk of confusion, selection of a (general) reference radiation quality would in principle provide obvious advantages. Initially, 180 kV to 220 kV X-rays were selected as the reference radiation quality to define the RBE(s), because of their wide availability [33]. Later on higher photon energies (gamma ray of the ^{60}Co , photons of about 2 MV to 35 MV produced by linear accelerators) progressively became the reference [27]. No significant RBE variation could be detected in this high-energy photon range; it was not the case initially with the 200 kV X-rays. These conclusions can be expected from the microdosimetric data, see Figures 20 and 21.

4.2.3 Relevant RBE experimental data

Fast neutron beams Several series of comprehensive and carefully performed experimental data with fast neutrons (high-LET) showed that the RBE of fast neutrons, compared to photons (low-LET), increases with decreasing dose, see Figures 11 and 12. On the other hand, the RBE for normal tissue tolerance is, in general, higher for late effects than for early effects.

Proton beams For protons a “generic RBE” of 1.1 was recommended for all clinical relevant applications [31]. In addition, a small RBE increase of about 5 % to 10 % has been reported at the end of the proton spread-out Bragg peak; it can be interpreted by the microdosimetric data, see Section 4.2.4. A larger RBE increase has been reported in the descending part of the depth-dose curve, see Figure 13. It results in a shift of about 1 mm to 2 mm of the isoeffective depth-dose curve, see Figure 14. Its clinical significance is still a matter of debate.

Ion beams The radiobiological data obtained with ions heavier than helium are in general similar to those expected from the fast neutron data. Indeed they both are called “high-LET radiations”. Briefly, the RBE increases with LET up to about 100 keV/ μm . Beyond that LET level the RBE decreases because of the “overkill effect”, see Figure 15. Figure 16 confirms these data but also illustrates that even at the same value of LET_∞ the RBE varies with ion type. This is a result of differences in the fine structure of energy deposition for different particle types even with the same LET_∞ . It shows that LET_∞ , while often adequate and useful, is not a perfect predictor of RBE. The variation of RBE with depth in the clinical carbon-ion beam in Chiba is shown in Figure 17. The intestinal crypt generation in mice is used as the biological system. For another tissue (skin reactions on mice), Table 4 gives the RBE as a function of LET (or depth) and fraction number (or dose per fraction) [43].

From the data available at present (only some of them being presented above as illustration) it can be concluded that, in contrast to protons, a single (generic) RBE value cannot be recommended for carbon ions. The RBE varies significantly with several factors among them ion type, depth in the tissues, delivery conditions (scatter or scanning), LET, dose per fraction, biological system and effect,

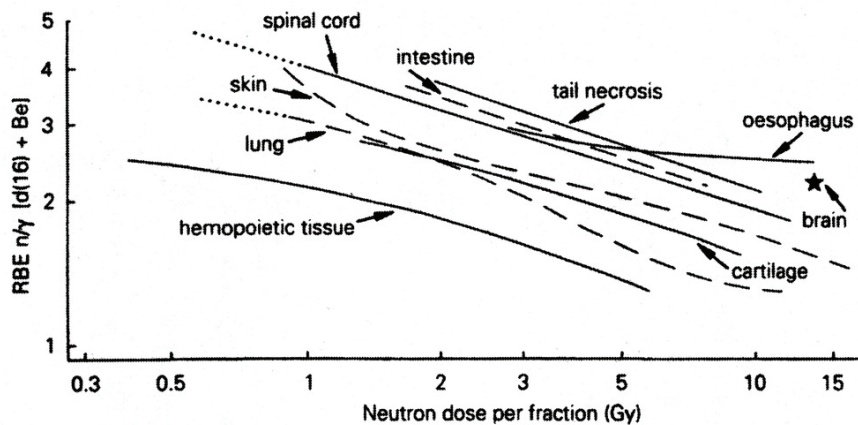


Figure 11: RBE-dose relationships for different normal tissues determined at the 16 MeV Hammersmith cyclotron. The increase of RBE with decreasing dose per fraction is obvious for all tissues [46].

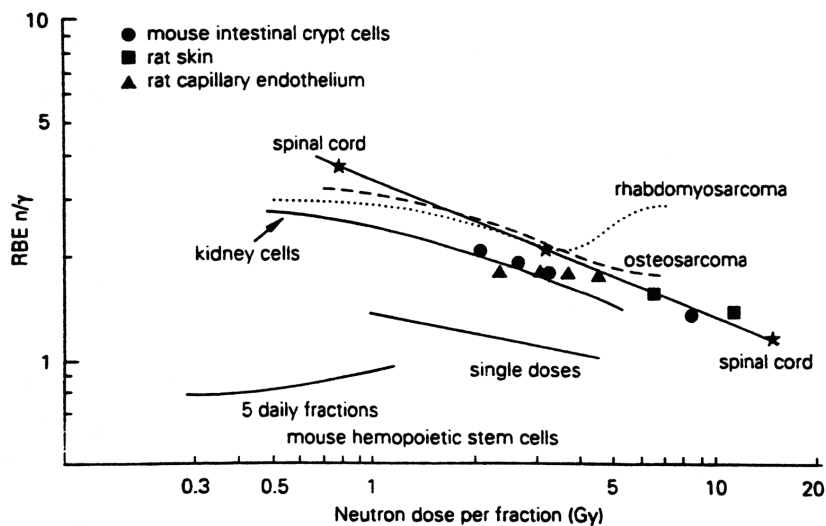


Figure 12: RBE-dose relationships for different normal tissues and tumours determined at the (d+T) 15 MeV neutron generator in Amsterdam. The RBE increases with decreasing dose per fraction and tends to reach a plateau value. Note also the higher RBE values for late as compared to early responding normal tissues [46].

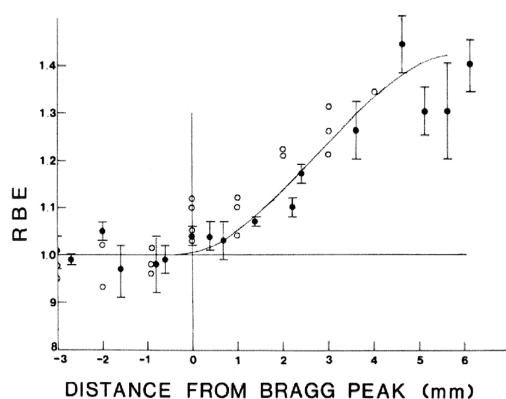


Figure 13: RBE determined for H4 cells (surviving fraction 0.1) in a 160 MeV proton beam with a 5 cm SOBP. The RBE is normalised to the mid-point of the distal Bragg peak contributing to the SOBP [40].

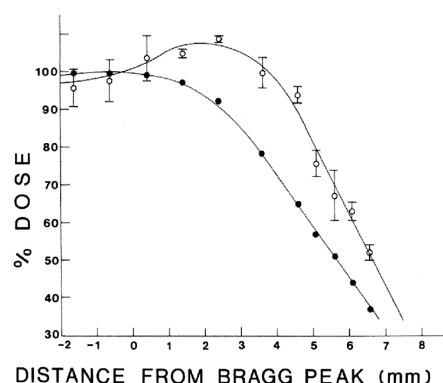


Figure 14: Depth-dose curves for (physical) absorbed dose (filled circles) and isoeffective dose (open circles) normalised as in Figure 13 [40].

etc. When reporting an ion-beam treatment it is thus important to specify all relevant irradiation parameters.

4.2.4 Interpretation of the RBE data based on microdosimetric spectra

The RBE variations can be interpreted using the microdosimetric spectra of the different beam qualities.

Fast neutrons The dose deposit of fast neutrons in living tissues is mainly due to the energy transfer from neutrons to recoil protons. These protons are very low energy protons having thus a very high LET. Therefore, compared to cobalt-60, the fast neutron y -spectra (see Figure 18) are significantly shifted towards the high y -values which allow one to interpret the high (“clinical”) RBE values (about 3 to 5). Fast neutrons are “high-LET” beams.

Proton beams In contrast, the y -spectra for protons are moderately shifted towards the high y -values which can justify the 1.1 (“generic”) RBE value, see Figure 19. In addition the further modest shift within the SOBP as a function of depth explains the further RBE increase, see Figures 13 and 14.

180 kV to 200 kV and higher energy photons Relative to cobalt-60, 180 kV X-rays show z -spectra slightly shifted towards the high values that explain the slightly higher RBE values (1/0.85) for the conditions of clinical applications. Like proton beams the 180 kV to 200 kV X-rays are “low-LET” radiations, see Figure 20. Note that at low doses and for cancer induction and genetic effects, RBE values may be as high as 2 to 3 [34]. There is no variation in the microdosimetric spectra and no significant RBE variation between photons and electrons with energies above 1 MeV (today the “reference” radiation quality), see Figures 20 and 21.

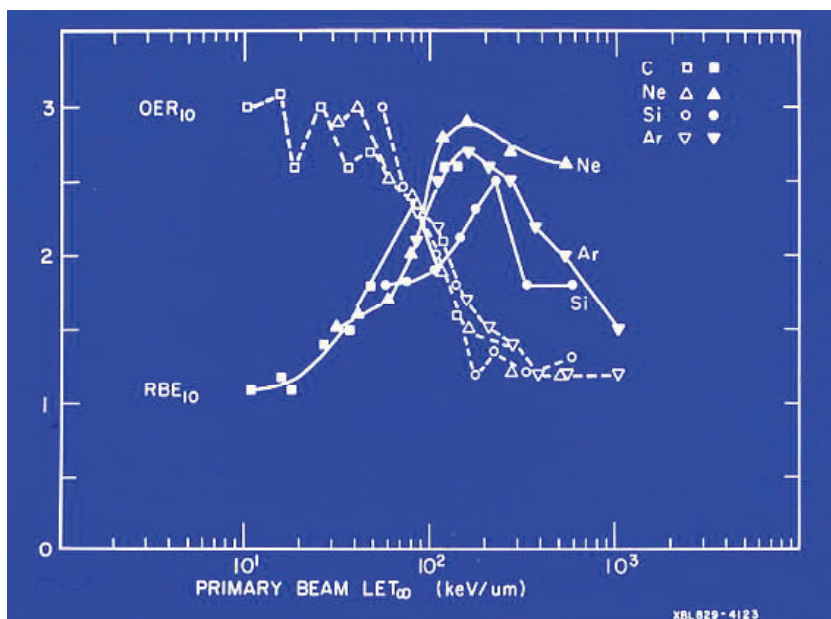


Figure 15: Radiobiological characteristics of different ion types. Variation of RBE and OER as a function of LET_∞ determined at Berkeley laboratory for various depths in spread-out Bragg peaks of carbon, neon, silicon, and argon ions [2].

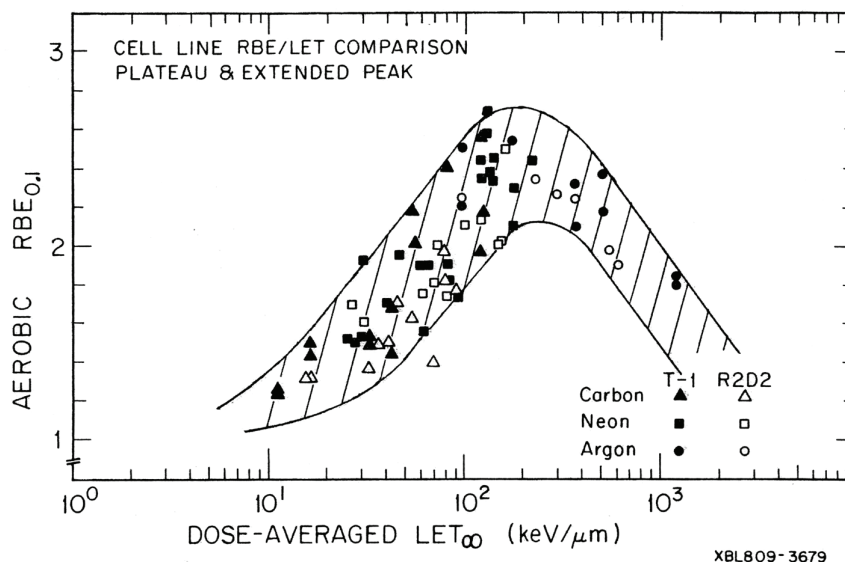


Figure 16: RBE determined for survival for T-1 and R2D2 cells as a function of LET_∞ determined at Berkeley for various depths in spread-out Bragg peaks for carbon, neon, and argon ions [2].

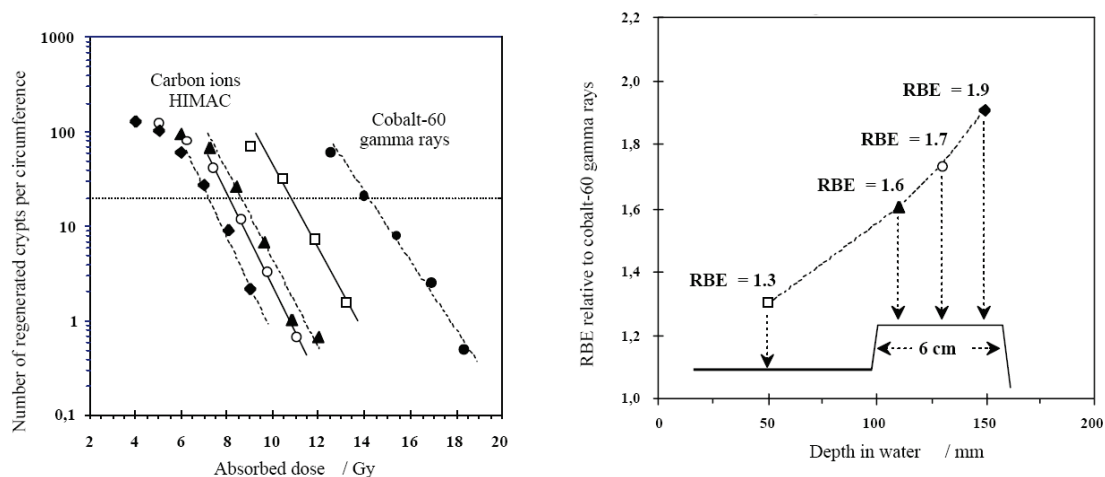


Figure 17: Dose-effects curve determined at different depths in the carbon-ion beam at HIMAC after a single fraction irradiation. The biological effect is the number of regenerating intestinal crypt cells per circumference (left); the RBE is evaluated for 20 crypts (^{60}Co gamma rays are the reference radiation quality). The RBE increases from 1.3 at the initial plateau of the carbon ion-beam to 1.9 at the distal part of the SOBP (right) [15].

Position	LET keV/ μm	RBE values		
		single fraction cell culture	single fraction skin reaction	four fractions skin reaction
Entrance	22	1.8	2.0	—
SOBP (6 cm)				
Proximal	42	2.1	2.1	2.3
	45	2.2	2.2	—
Middle	48	2.2	2.3	—
	55	2.4	2.3	—
Distal	65	2.6	2.3	2.9
	80*	2.8	2.4	3.1
Distal fall-off	100	—	—	3.5

* The linear energy transfer (LET) value of fast neutrons used in cancer treatment at the National Institute of Radiological Sciences is also 80 keV/ μm [43].

Table 4: Relative biological effectiveness (RBE) values of modulated 290 MeV/u carbon-ion beams of the heavy-ion medical accelerator in Chiba.

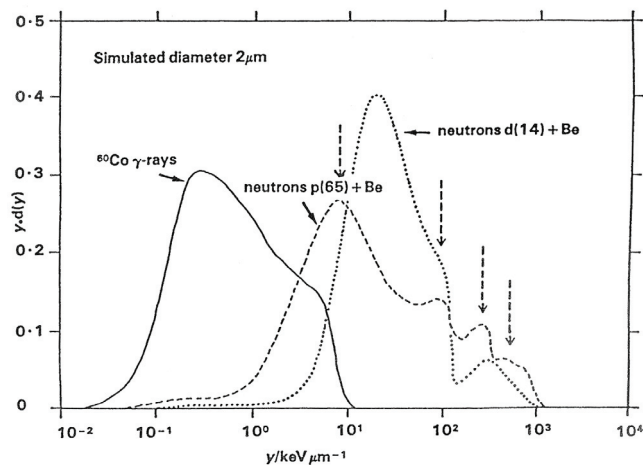


Figure 18: Comparison of the microdosimetric spectra $y.d(y)$ versus y obtained for ^{60}Co γ -rays, $d(14)+\text{Be}$ neutrons and $p(65)+\text{Be}$ neutrons, i. e. the lowest and highest neutron energies applied for therapy, respectively. y is the lineal energy and $d(y)$ is the probability density of absorbed dose in y . For ^{60}Co γ -rays, the maximum $y.d(y)$ value occurs at about $0.3 \text{ keV}/\mu\text{m}$ and for $d(14)+\text{Be}$ neutrons it occurs at about $20 \text{ keV}/\mu\text{m}$. Four peaks are observed in the $p(65)+\text{Be}$ neutron spectrum (vertical arrows): at about $8 \text{ keV}/\mu\text{m}$, $100 \text{ keV}/\mu\text{m}$, $300 \text{ keV}/\mu\text{m}$ and $700 \text{ keV}/\mu\text{m}$, corresponding to high-energy protons, low-energy protons, ^4He particles and heavy recoil nuclei, respectively [38].

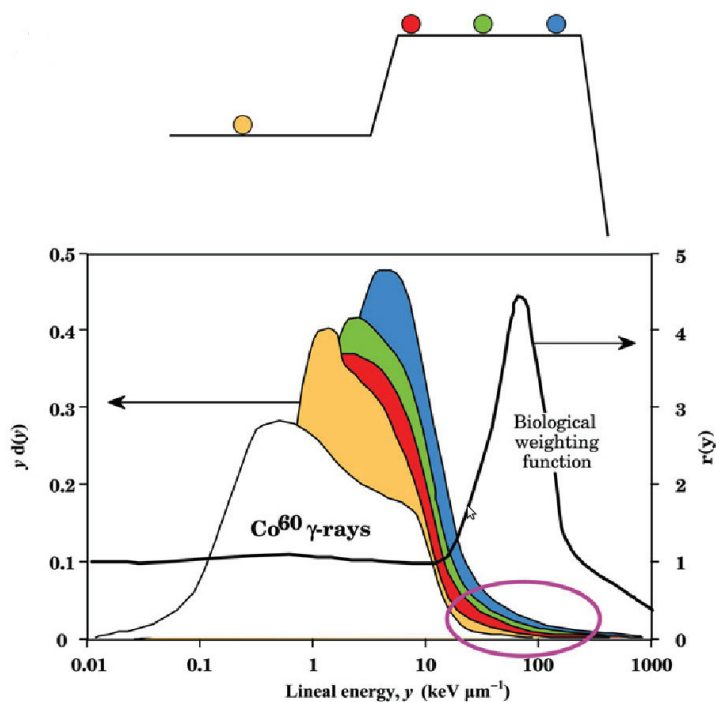


Figure 19: Microdosimetric ($y.d(y)$ versus y) spectra in a 90 MeV modulated-energy proton beam. Measurements performed in the initial plateau (1), and at the proximal (2), middle (3) and distal (4) parts of the SOBP (as indicated on the top of the figure). Compared with ^{60}Co , the proton spectra are slightly shifted towards the high y -values which explains the 10 % increase in RBE [31].

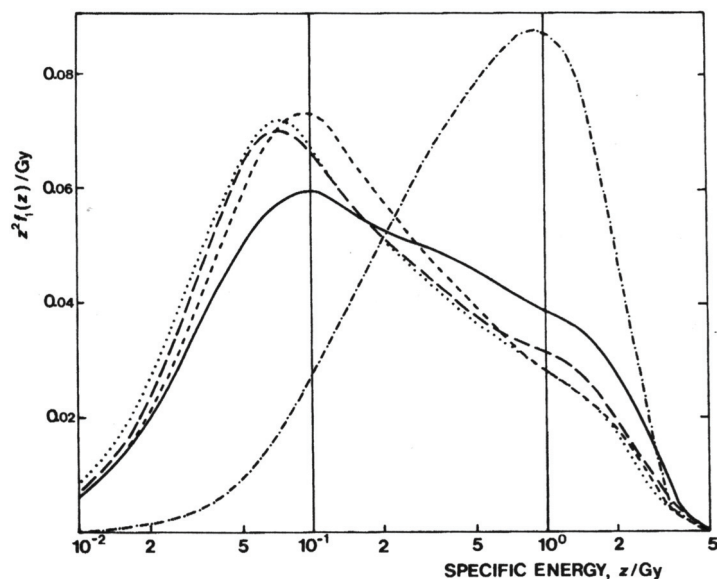


Figure 20: Microdosimetric spectra for beams of photons and electrons. Single-event specific-energy (z) distributions measured in five different beams, at the maximum of the depth-dose curves:

- cobalt-60 gamma rays
- · - · 180 kV X-rays with HVL = 0.9 mm Cu
- - - - 39 MeV electrons
- · · · · 8 MeV electrons
- - - - 42 MV X-rays

The distributions are normalised per logarithmic interval and thus equal areas under the curve will contribute equally to the specific energy [22, 26].

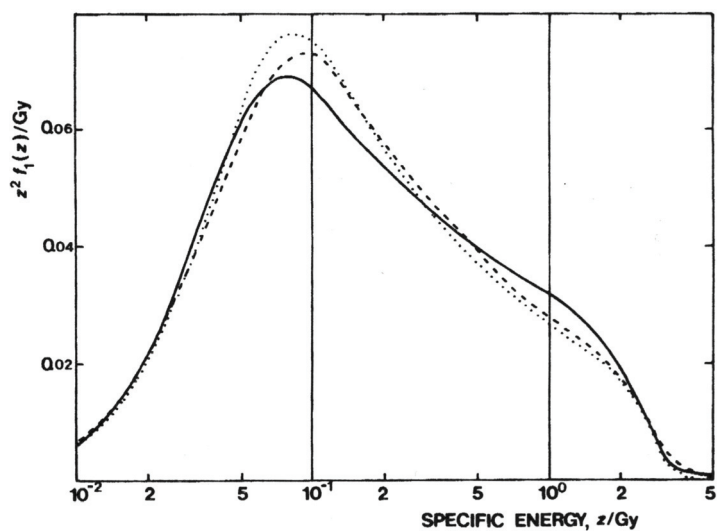


Figure 21: Single-event specific-energy (z) distributions measured in an electron beam at different depths in the irradiated phantom:

- · · · · 0.5 g/cm² i. e. 97 % depth dose level
- - - - 2.4 g/cm² i. e. 100 % depth dose level
- 5.7 g/cm² i. e. 66 % depth dose level

The most probable electron energy at the phantom surface is 15 MeV. The normalisations are the same as in Figure 20 [22, 26].

4.3 The isoeffective dose

4.3.1 Need for weighting of absorbed dose

As indicated in Section 4.1, the quantity absorbed dose is essential in radiation therapy and influences directly the biological effects. However, when altering treatment protocols or designing new protocols additional information is needed for predicting the outcome of a treatment. In particular when treatments delivered under different irradiation conditions are compared, combined and added weighting of the absorbed dose is necessary.

All factors that could influence the clinical outcomes have to be taken into account. The numerical values of these weighting factors may vary significantly with the biological systems or effects considered (e. g. early or late effects, cancer induction), physiological conditions of the irradiated system and technical irradiation conditions (e. g. degree of oxygenation, temperature). They may also be influenced by the pathological conditions of the patient, anaemia, previous and/or concomitant chemotherapy that are known to affect the clinical outcome. For these reasons treatments delivered with high-LET radiations such as carbon-ion, radiation quality (and the resulting RBE differences) raises complex issues that are still a matter of clinical and radiobiological debate. The RBE concept was the subject of Section 4.2.

Lastly, comparison of total treatment doses delivered using different therapy modalities implies that they are specified in the same way. For example, at a dose level selected on the DVH curve, e. g. median D_{50} or near-minimum dose D_{98} [31, 32] and/or selected relevant point(s) [29, 30]. For these reasons, when treatments delivered using different therapy modalities or protocols have to be compared, and to make this comparison easier and avoiding confusion and bias, the concept of “isoeffective absorbed dose” was introduced jointly by the IAEA and the ICRU for radiation therapy applications, see Figure 22 [24].

4.3.2 Definition

The isoeffective absorbed dose concept has been designed exclusively for radiation-therapy applications for comparing the total doses prescribed (delivered) to the PTV when different treatment modalities are applied. The isoeffective dose, D_{IsoE} , is defined as the product of the absorbed dose, D , and a weighing factor W_{IsoE} which takes into account the effects of all factors that could influence the outcome (mainly, dose per fraction, overall time, dose rate and radiation quality):

$$D_{\text{IsoE}} = D \times W_{\text{IsoE}}. \quad (2)$$

D is expressed in Gy, W_{IsoE} is dimension less, D_{IsoE} is thus also expressed in Gy which could raise some confusion. A given value of D_{IsoE} (or W_{IsoE}) is meaningful only to the extent that the following conditions are fulfilled:

1. The reference irradiation conditions are specified (dose per fraction, overall time, radiation quality).
2. The biological systems and effects for which D_{IsoE} and W_{IsoE} have been selected should be specified. Different numerical values of D_{IsoE} and W_{IsoE} could be obtained for other biological systems or effects, e. g. late or early.

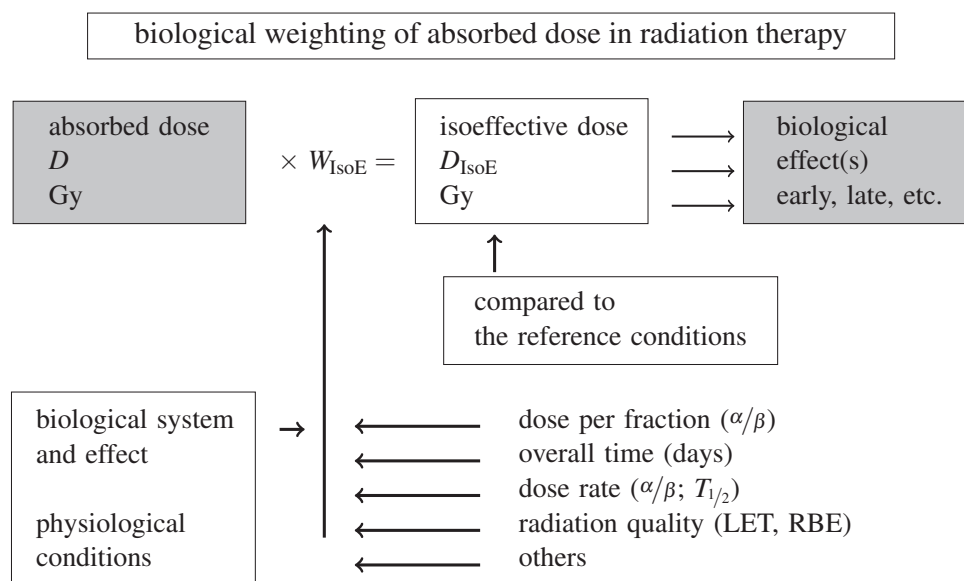


Figure 22: The isoeffective dose (D_{IsoE}) is the absorbed dose that delivered under the reference conditions would produce the same biological effect (e. g. late/early) in a given system as the actual treatment, all other conditions being the same. D_{IsoE} is the product of the absorbed dose and a weighting factor that includes all factors that influence the biological effects. The volume (PTV) for which D_{IsoE} is defined, the method of dose specification to that volume and the reference conditions must be given. As shown in the figure, these factors could be related to the radiation parameters and/or the biological systems and effects; they are in general not independent from each other [24].

3. The tissue volume selected for evaluation of the isoeffective dose is specified. The isoeffective dose concept was introduced in relation to the PTV being mainly relevant for the evaluation of the efficiency of the treatment.
4. The method used to specify the prescribed (delivered) dose to the PTV is indicated (DVH curve and/or selected relevant points). It should of course be the same for the compared treatment modalities.

The concept of isoeffective doses can be extended to organs at risk. Similar procedures as for the PTV should be followed. The isoeffective doses to the organs at risk are mainly relevant for tolerance studies. The methods used to perform the dose weightings and to evaluate the “equivalences” should of course be fully specified, allowing to repeat the evaluation of the “equivalence” using different biological and clinical hypotheses. Harmonisation (and agreement at the international level) on the methods used to evaluate the “equivalence” between different treatment modalities is one of the major goals of the ICRU.

4.3.3 Reference treatment modality

Each time two (or more) different treatment modalities are compared, one of them has to be selected as the reference modality and weighting factors have to be applied to the other ones (similar approach as for the RBE concept, see Section 4.2).

The current treatment protocol Today, a large majority of patients are treated with photons delivered with fractions of 2 Gy, five times a week. A large amount of clinical information has been accumulated with this schedule. It is widely accepted by the radiation-oncology community and the relationships between dose and clinical outcome are well established: the radiation oncologists are familiar with the numerical values associated with the clinical outcomes. This broad clinical information should not be neglected. The 2 Gy photon fractions may be kept as the reference when comparing treatments that are not too different, e. g. doses per fraction not larger than about 5 Gy as long as the linear-quadratic model can still be used safely.

New treatment modalities However, new fractionation schemes are being tested with photons. “Hypofractionation” schedules have been introduced for lung and brain tumours and, in contrast, protocols including 1.8 Gy per fraction in combination with chemotherapy are becoming the classical treatment for some clinical pathologies, e. g. extended cervix carcinoma. For these new approaches it is recognised that other reference conditions may be more appropriate than 2 Gy per fraction. Special techniques such as treatment of uveal melanomas, stereotactic techniques, radio-surgery, permanent seed implants, administration of un-sealed sources, etc. require selection of very specific reference conditions. Application of high-LET radiation (carbon ions) brings in additional difficulties for designing comparisons as the biological effects may be different in type and size after high- and low-LET irradiation. Late effects are more pronounced than early effects and the influence of dose per fraction is reduced after high-LET irradiation.

Recommended reference treatment modality – the EQD2 Based on the arguments presented above (large experience, wide practice, well known numerical dose values, etc.), irradiation delivering photons at 2 Gy per fraction, five fractions per week to the PTV is recommended as the reference treatment modality for photon treatments provided the actual fractionation is not too different from 2 Gy, e. g. less than about 5 Gy per fraction. If this treatment modality is selected as the reference, the evaluated isoeffective total dose to the PTV is called “equivalent dose in 2-Gy fractions (EQD2)” [47]. This terminology is increasingly applied. EQD2 is thus a particular case of isoeffective absorbed dose and is expressed in Gy.

For a given treatment, several isoeffective doses can be evaluated depending on the selected reference modality. For example, a carbon-ion dose at the centre of the SOBP can be compared to carbon ions at the initial plateau, or to protons, or to photons at the same fractionation or at the 2 Gy fractionation. It is self-evident that the same reference treatment modality must be accepted and agreed upon by all teams participating in the same collaborative study. The selected reference conditions must *always* (and repeatedly) be specified clearly as many times it is useful to avoid confusion or bias.

5 Open questions on reporting ion-beam therapy

5.1 Absorbed dose in ion-beam therapy

Absorbed dose is a fundamental quantity in radiation therapy: all radiobiological effects critically depend (but not only) on absorbed dose. Therefore, as a general rule, the ICRU recommends that for all therapy modalities the (“physical”) absorbed dose(s) be reported at reference points and/or in relevant volumes, together with a complete description of the treatment conditions in order to allow full understanding, interpretation and reconstruction (if needed) of the treatment [29, 32].

As absorbed dose is a pure physical quantity, there is no need to imply any biological hypothesis or model.

Depending on the treatment modality, the ICRU has recommended two approaches for reporting the dose to the PTV:

1. Dose reporting based on the DVH curve of the PTV; on that curve the median dose (D_{50}) and the near-minimal dose (D_{98}) have been recommended for reporting [31, 32].
2. Dose at the ICRU Reference Point. This point selected at the centre (or in the central part) of the PTV
 - should be representative of the dose to the PTV,
 - easy to define in a clear and unambiguous way,
 - where the dose can be determined accurately,
 - where there is no dose gradient.

The clinical relevance and the limitations of this selection have been discussed in detail in [29, 30].

In the present report for ion-beam therapy, it is recommended to report both the absorbed dose at Reference Point(s), i. e. centre of the SOBP, in addition to D_{50} and D_{98} . Reporting together absorbed dose at reference point(s) and points on DVH is justified because different beam delivery modalities (passive beam scattering and scanning beams) are used (or have been planned) on which our clinical experience today is based.

5.2 Absorbed dose and isoeffective dose

As discussed in the previous sections, the biological effects depend not only on the (physical) absorbed dose but also on irradiation conditions such as (mainly) dose per fraction, dose rate, overall treatment time, LET, etc. Therefore when comparing, combining and/or adding doses delivered under different treatment modalities, absorbed doses alone are not sufficient. This justifies the introduction of the concept of the isoeffective dose. It is the product of the absorbed dose and a weighting factor which takes into account the effects of all factors that could influence the treatment outcome such as (mainly) dose per fraction, overall time, radiation quality, etc. The biological system and effect (early/late) on which the selection of the isoeffective reference modality is based should be reported.

When passive scattering and few ion beams are used, it is more straightforward to specify the absorbed dose and the isoeffective dose at the ICRU Reference Point, e. g. at the centre of the SOBP. In contrast,

when scanning beam is used selection of a reference point is difficult and selected doses on the DVH are more appropriate. The method used to specify the PTV dose has to be the same for the reference and the actual treatment modality.

5.3 Clinical constraints

The dose prescribed (and delivered) to the PTV is a compromise between the therapeutic efficiency and a series of constraints. Some of the constraints are related to the dose to the PTV (e. g. +7%, –5%) or to the “subPTVs” when applicable. However, the constraints are mainly related to the dose distribution to the OAR (or PRVs). They can be expressed in terms of maximum organ doses or dose-volume distributions based on the DVH (depending in particular to the type of tissue “serial” or “parallel” like).

On the other hand, constraints criteria for normal tissue at risk (spinal cord, eye, heart, rectum, etc.) could be based on the weighted doses. The methods used to perform this weighting and to evaluate the “equivalences” should be specified, allowing one to repeat the evaluation of the “equivalence” based on different biological hypotheses. Harmonisation (and agreement at the international level) on the methods used to evaluate the “equivalence” between different treatment modalities is one of the goals of the ICRU.

5.4 An historical dilemma

High-LET particles have different biological effectiveness compared to photons: reduction of the OER, reduction of the radiosensitivity related to the cell cycle, less repair, etc. This is the main rationale for using carbon ions in radiation therapy. Two main approaches have been used for including radiobiological effects into treatment planning for ion beam therapy.

At NIRS (National Institute of Radiological Science) in Chiba, Japan, the passive scattering technique is used. A non-uniform SOBP is realised with passive devices (ridge filters). Ridge filters are shaped to obtain a lower physical dose in the distal margin of the SOBP. The shape of the physical dose profile is calculated in order to achieve a flat survival of HSG cell lines at 10 % survival level. Different ridge filters are used for different width of SOBP. Based on past clinical neutron experience the resulting biological dose (i. e. the isoeffective dose when the HSG cell lines survival is considered as an end-point) is multiplied by 1.5 to obtain a “clinical equivalent dose”. In clinical practice at NIRS, RBE is reported as “clinical equivalent dose” in the middle of SOBP divided by physical dose in the middle of SOBP. Ridge filters are not redesigned if different dose per fractions are employed (which would not produce neither 10 % survival nor flat survival within the SOBP for HSG cell lines). Therefore in the NIRS approach RBE value is derived from clinical neutron experience and experimental data, its variability along the SOBP and for different target size is considered but its variability respect to fraction size and tissue/tumour type is disregarded. To clarify with examples: RBE in the middle of a 4 cm SOBP is considered fixed at 2.62, this means that in NIRS reports a 4 cm tumour to which 4.4 GyE are prescribed will receive in the middle of the SOBP $4.4/2.62 = 1.68$ Gy. If 8.8 GyE are prescribed, the RBE in middle SOBP is considered fixed and therefore the same 4 cm tumour will receive $8.8/2.62 = 3.36$ Gy. If a sarcoma or a lung cancer is considered this values do not change as dependency of RBE on tumour type is disregarded. On the contrary if a bigger tumour is treated, a different ridge filter is used that has different shape of physical dose and different mid-SOBP RBE. For example the mid-SOBP of the 12 cm ridge filter is 2.1, so the same prescriptions doses in terms

of GyE would result in a different physical dose. 4.4 GyE to a 12 cm target means that the central part of it receives $4.4/2.1 = 2.1$ Gy. RBE in NIRS approach depends on tumour size. Even more relevant is to highlight that RBE in NIRS approach changes along the SOBP, so the reported mid-SOBP RBE value is only a synthetic parameter but without the shape of each SOBP physical dose profile does not fully describe NIRS method.

A different approach is used at GSI and HIT, Germany. RBE values are estimated by using the Local Effect Model (LEM). The basic principle of the LEM is to convolute the heterogeneous energy distribution in the particle track with the non-linear photon dose effect curve. With this procedure the effects of the particle can be evaluated on the basis of the photon dose effect curve. The LEM is ideally suited for use as an integral part of treatment planning code systems for active dose shaping devices like the GSI raster scanning system. It has been incorporated into GSI homemade treatment planning system for ion therapy (TRiP), see Figure 23.

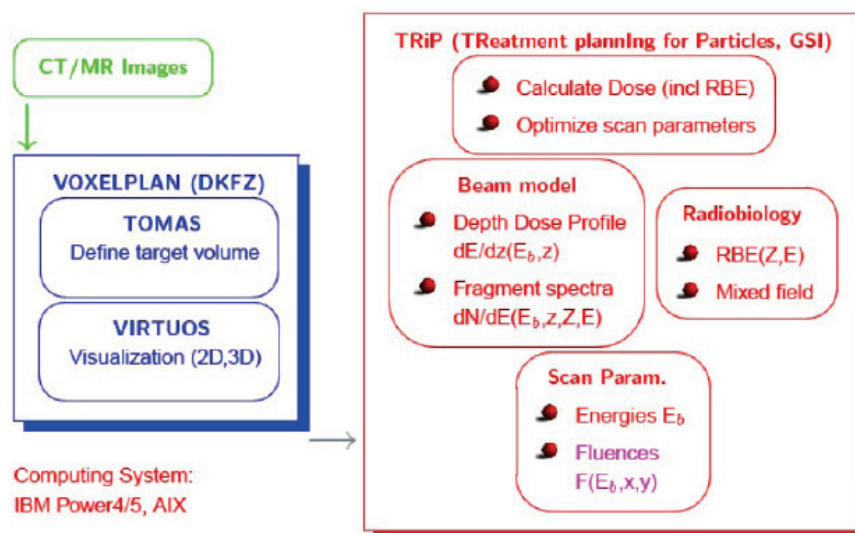


Figure 23: Architecture and conception of TRiP treatment planning system (M. Krämer).

CONCLUSIONS

In low-LET radiotherapy the radiation quality (LET or microdosimetric “y” spectra) does not vary significantly within the irradiated volumes. By contrast in carbon-ion therapy the radiation quality (particle energy spectrum) greatly varies within the treated volume, in particular with depth in tissues. Each voxel in the treated volume receives a mixed field of particles. Part of the energy is deposited by low-LET particles (i.e. small fragments or fast carbon ions) and another part of the energy is deposited by high-LET particles (i.e. slow carbon ions). The same physical dose at a given point (or voxel) may correspond to different particle spectra – each of them could lead to a particular biological and then clinical effect.

In low-LET radiotherapy for the past decades a uniform absorbed dose was currently prescribed to the target volumes. However modern imaging techniques (e.g. PET, MRI) have demonstrated that the target volumes are in general not homogeneous in terms of e.g. oxygenation or proliferation. As a result, the optimal dose distribution is probably not achieved with a uniform absorbed doses distribution. With modern low-LET techniques such as IMRT and proton-beam therapy more complex, non-uniform dose distributions are often prescribed (“dose painting”).

To follow the same approach with high-LET beams, in addition to the (physical) absorbed dose one has to take into account the biological effectiveness at the level of the voxels, and aim to achieve a uniform isoeffective dose. As the LET spectrum depends on depth, an heterogeneous physical dose needs often to be planned in order to achieve a homogeneous biological dose.

Thus, to master the clinically relevant dose in high-LET radiotherapy one must master the physical dose distribution voxel by voxel in the volume of interest. Therefore it could be considered to further modulate the physical dose distribution taking also into account the possible intra-tumoral variation of biological characteristics. Most probably this is not achieved with a uniform dose but presently it is not possible to precisely determine the inhomogeneity within the tumour and perform such an adequate dose painting.

The remarks above are clearly showing that a very refined tune of the physical dose is necessary to obtain the wanted biological effect. Since we are presently unable to define this biological effect as an absolute quantitative value, for instance a certain rate of cell death or inactivation, we are continuing to rely on a relative definition of the biological goal that is the “RBE” principle. The term “RBE”, as often used in this context, includes the RBE in the strict sense but also the other factors (fractionation, biological system and effect, etc.) that influence the isoeffective dose.

In conclusion, there are at least two relevant open issues:

1. comparison of different carbon-ion radiotherapy plans in which “RBE” is calculated with different models;
2. clinical validation of “RBE” models.

When two treatment plans must be compared which have not been computed in the same ways, the only possible solution is to go back to the available physical data and “reevaluate” both plans using the same radiobiological model. Each treatment planning system (TPS) has a model that can be divided in two parts: the mathematical “machinery” of the model and the radiobiological based data set. Physical quantities (absorbed dose, LET spectra for each voxel) are the input for radiobiological models that calculate isoeffective doses. Treatment may be reported giving the simulation CT data and for each voxel the LET spectra of carbon ions and its fragments. It appears presently that the best way to apply carbon-ion therapy is to prescribe and report isoeffective doses, and to keep track as archived data

of all physical information and radiobiological data/models needed/used to calculate this isoeffective dose.

REFERENCES

- [1] P. Aaltonen-Brahme, A. Brahme, I. Lax, S. Leverages, I. Näslund, J.B. Reitan, and I. Turesson. Specification of dose delivery in radiation therapy. *Acta Oncol*, 36(Suppl 10):1–32, 1997.
- [2] E.A. Blakely, F.Q.H. Ngo, S.B. Curtis, and C.A. Tobias. Heavy-ion radiobiology: Cellular studies. *Adv. Radiat. Biol.*, 11:295–389, 1984.
- [3] Thomas Bortfeld, Kimmo Jokivarsi, Michael Goitein, Jong Kung, and Steve B. Jiang. Effects of intra-fraction motion on IMRT dose delivery: statistical analysis and simulation. *Physics in Medicine and Biology*, 47(13):2203–2220, 2002.
- [4] BIPM (Bureau International des Poids et Mesures). The International System of Units (SI), 8th Edition. 92312 Sèvres Cedex, 2006.
- [5] Johannes Dimopoulos, Gertrude Schirl, Anja Baldinger, Thomas Helbich, and Richard Pötter. MRI assessment of cervical cancer for adaptive radiotherapy. *Strahlentherapie und Onkologie*, 185(5):282–287, 2009.
- [6] S.B. Edge, D.R. Byrd, C.C. Compton, A.G. Fritz, F.L. Greene, and A. Trotti, editors. *Cancer Staging Manual (AJCC American Joint Committee on Cancer)*. Springer, 7th edition, 2010.
- [7] Xavier Geets, Jean-Francois Daisne, Milan Tomsej, Thierry Duprez, Max Lonneux, and Vincent Grégoire. Impact of the type of imaging modality on target volumes delineation and dose distribution in pharyngo-laryngeal squamous cell carcinoma: comparison between pre- and per-treatment studies. *Radiother Oncol*, 78(3):291–297, March 2006.
- [8] Xavier Geets, Milan Tomsej, John A. Lee, Thierry Duprez, Emmanuel Coche, Guy Cosnard, Max Lonneux, and Vincent Grégoire. Adaptive biological image-guided IMRT with anatomic and functional imaging in pharyngo-laryngeal tumors: Impact on target volume delineation and dose distribution using helical tomotherapy. *Radiother Oncol*, 85(1):105–115, October 2007.
- [9] Michael Goitein. The cell's-eye view: Assessing dose in four dimensions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 62(4):951–953, July 2005.
- [10] V. Grégoire, E. Coche, G. Cosnard, M. Hamoir, and H. Reychler. Selection and delineation of lymph node target volumes in head and neck conformal and intensity-modulated radiation therapy. In V. Grégoire, P. Scalliet, and K. K. Ang, editors, *Clinical Target Volumes in Conformal and Intensity Modulated Radiation Therapy – A Clinical Guide to Cancer Treatment*, chapter 3, pages 69–90. Springer, 1st edition, November 2003.
- [11] V. Grégoire, K. Haustermans, and J. Lee. Molecular image-guided radiotherapy using positron emission tomography. In M. Joiner and A. van der Kogel, editors, *Basic clinical radiobiology*, chapter 20, pages 271–286. Hodder Arnold, London, 2009.
- [12] Vincent Grégoire, Avraham Eisbruch, Marc Hamoir, and Levendag Peter. Proposal for the delineation of the nodal CTV in the node-positive and the post-operative neck. *Radiother Oncol*, 79(1):15–20, April 2006.
- [13] V. Grégoire, P. Scalliet, and K. K. Ang, editors. *Clinical Target Volumes in Conformal and Intensity Modulated Radiation Therapy – A Clinical Guide to Cancer Treatment*. Springer, 1st edition, November 2003.
- [14] John Gueulette, Hans Blattmann, Eros Pedroni, A. Coray, Blanche M. De Coster, Pierre Mahy,

- André Wambersie, and Gudrun Goitein. Relative biologic effectiveness determination in mouse intestine for scanning proton beam at Paul Scherrer Institute, Switzerland. Influence of motion. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 62(3):838–845, July 2005.
- [15] John Gueulette, Michèle Octave-Prignot, Blanche-Marie De Coster, André Wambersie, and Vincent Grégoire. Intestinal crypt regeneration in mice: a biological system for quality assurance in non-conventional radiation therapy. *Radiother Oncol*, 73:S148–S154, December 2004.
- [16] Christine Haie-Meder, Richard Pötter, Erik Van Limbergen, Edith Briot, Marisol De Brabandere, Johannes Dimopoulos, Isabelle Dumas, Taran Paulsen Hellebust, Christian Kirisits, Stefan Lang, Sabine Muschitz, Juliana Nevinson, An Nulens, Peter Petrow, and Natascha Wachter-Gerstner. Recommendations from Gynaecological (GYN) GEC-ESTRO Working Group* (I): concepts and terms in 3D image based 3D treatment planning in cervix cancer brachytherapy with emphasis on MRI assessment of GTV and CTV. *Radiotherapy and Oncology*, 74(3):235–245, March 2005.
- [17] Roland Haubner. PET radiopharmaceuticals in radiation treatment planning – Synthesis and biological characteristics. *Radiother Oncol*, 96(3):280–287, September 2010.
- [18] Robert Jeraj and Paul Keall. The effect of statistical uncertainty on inverse treatment planning based on Monte Carlo dose calculation. *Physics in Medicine and Biology*, 45(12):3601–3613, 2000.
- [19] M.W. Kissick, S.A. Boswell, R. Jeraj, and T.R. Mackie. Confirmation, refinement, and extension of a study in intrafraction motion interplay with sliding jaw motion. *Med Phys*, 32(7):2346–2350, Jul 2005.
- [20] T. Landberg, A. Wambersie, A. Akanuma, et al. Margins in radiotherapy. Specification of electron beam treatment (abstract). 15th Annual ESTRO Meeting, Vienna, 1996.
- [21] Karen Lim, Valerie Kelly, James Stewart, Jason Xie, Young-Bin Cho, Joanne Moseley, Kristy Brock, Anthony Fyles, Anna Lundin, Henrik Reh binder, and Michael Milosevic. Pelvic radiotherapy for cancer of the cervix: Is what you plan actually what you deliver? *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*Physics*, 74(1):304–312, May 2009.
- [22] L. Lindborg. Microdosimetry measurements in beams of high energy photons and electrons: Technique and results. In J. Booz, H.G. Ebert, and B.G.R. Smith, editors, *Proceedings of the Fifth Symposium on Microdosimetry*, Report No. EUR 5452, page 347. Commission of the European Communities, Luxembourg, 1976.
- [23] Clifton C Ling, John Humm, Steven Larson, Howard Amols, Zvi Fuks, Steven Leibel, and Jason A Koutcher. Towards multidimensional radiotherapy (MD-CRT): biological imaging and biological conformality. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 47(3):551–560, June 2000.
- [24] IAEA (International Atomic Energy Agency), and ICRU (International Commission on Radiation Units and Measurements). Relative biological effectiveness in ion beam therapy. Technical Reports Series 461, International Atomic Energy Agency, Vienna, 2008.
- [25] ICRU (International Commission on Radiation Units and Measurements). Quantitative concepts and dosimetry in radiobiology. ICRU Report 30, Bethesda, Maryland, 1979.
- [26] ICRU (International Commission on Radiation Units and Measurements). Radiation dosimetry: Electron beams with energies between 1 and 50 MeV. ICRU Report 35, Bethesda, Maryland, 1984.

- [27] ICRU (International Commission on Radiation Units and Measurements). Prescribing, recording, and reporting photon beam therapy. ICRU Report 50, Bethesda, Maryland, 1993.
- [28] ICRU (International Commission on Radiation Units and Measurements). Fundamental quantities and units for ionizing radiation. ICRU Report 60, Woodmont Avenue, Bethesda, Maryland, USA, 20814-3095, 1998.
- [29] ICRU (International Commission on Radiation Units and Measurements). Prescribing, recording and reporting photon beam therapy (supplement to ICRU Report 50). ICRU Report 62, 7910 Woodmont Avenue, Bethesda, Maryland, 1999.
- [30] ICRU (International Commission on Radiation Units and Measurements). Prescribing, recording, and reporting electron beam therapy. ICRU Report 71, Oxford University Press, Vol 4, Nr 1, 2004.
- [31] ICRU (International Commission on Radiation Units and Measurements). Prescribing, recording and reporting proton beam therapy. ICRU Report 78, jointly with the IAEA (International Atomic Energy Agency), Journal of the ICRU, Oxford University Press, Vol 7, Nr 2, 2007.
- [32] ICRU (International Commission on Radiation Units and Measurements). Prescribing, recording, and reporting photon-beam intensity-modulated radiation therapy (IMRT). ICRU Report 83, Oxford University Press, Vol 10, Nr 1, 2010.
- [33] ICRP (International Commission on Radiological Protection). Report of the RBE Subcommittee to the International Commission on Radiological Protection and the International Commission on Radiation Units and Measurements. *Health Physics*, 9:357–386, 1963.
- [34] ICRP (International Commission on Radiological Protection). *ICRP Publication 103: Recommendations of the ICRP: Annals of the ICRP Volume 37/2-4 (International Commission on Radiological Protection) (v. 37/2-4)*. Elsevier, 2008.
- [35] B. O’Sullivan, J. Wunder, and P.W.T. Pisters. Target description for radiotherapy of soft tissue sarcoma. In V. Grégoire, P. Scalliet, and K. K. Ang, editors, *Clinical Target Volumes in Conformal and Intensity Modulated Radiation Therapy – A Clinical Guide to Cancer Treatment*, chapter 11, pages 205–227. Springer, 1st edition, November 2003.
- [36] C. Percy, A. Fritz, A. Jack, K. Shanmugarathan, L. Sobin, D.M. Parkin, and S. Whelan. *International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O)*. World Health Organization, 3rd edition, 2000.
- [37] M.H. Phillips, E. Pedroni, H. Blattmann, T. Böhringer, A. Coray, and S. Scheib. Effects of respiratory motion on dose uniformity with a charged particle scanning method. *Physics in Medicine and Biology*, 37(1):223–234, 1992.
- [38] P. Pihet, J. Gueulette, H.G. Menzel, R.E. Grillmaier, and A. Wambersie. Use of microdosimetric data of clinical relevance in neutron therapy planning. *Radiation Protection Dosimetry*, 23(1-4):471–474, June 1988.
- [39] Richard Pötter, Erik Van Limbergen, Wim Dries, Youri Popowski, Veronique Coen, Claudia Fellner, Dietmar Georg, Christian Kirisits, Peter Levendag, Hans Marijnissen, Hugo Marsiglia, Jean-Jaques Mazon, Boris Pokrajac, Pierre Scalliet, and Vittorio Tamburini. Recommendations of the EVA GEC ESTRO Working Group: prescribing, recording, and reporting in endovascular brachytherapy. Quality assurance, equipment, personnel and education. *Radiother Oncol*, 59(3):339–360, June 2001.

- [40] J.B. Robertson, J.R. Williams, R.A. Schmidt, J.B. Little, D.F. Flynn, and H.D. Suit. Radiobiological studies of a high-energy modulated proton beam utilizing cultured mammalian cells. *Cancer*, 35(6):1664–1677, Jun 1975.
- [41] Leslie H. Sobin, Mary K. Gospodarowicz, and Christian Wittekind, editors. *TNM Classification of Malignant Tumours (UICC International Union Against Cancer)*. Wiley-Blackwell, 7th edition, November 2009.
- [42] Kari Tanderup, Richard Pötter, Jacob Christian Lindegaard, Daniel Berger, André Wambersie, Erik van Limbergen, and Christian Kirisits. Margin concepts in image guided brachytherapy. In Jack Venselaar and Peter Hoskind, editors, *Comprehensive Clinical Brachytherapy*. Taylor and Francis, to be published.
- [43] H. Tsujii, S. Morita, T. Miyamoto, et al. Preliminary results of phase I/II carbon-ion therapy at NIRS. *J Brachyther Int*, 13:1–8, 1997.
- [44] Linda van de Bunt, Ina M. Jürgenliemk-Schulz, Gérard A.P. de Kort, Judith M. Roesink, Robert J.H.A. Tersteeg, and Uulke A. van der Heide. Motion and deformation of the target volumes during IMRT for cervical cancer: What margins do we need? *Radiotherapy and Oncology*, 88(2):233–240, August 2008.
- [45] Linda van de Bunt, Uulke A. van der Heide, Martijn Ketelaars, Gérard A.P. de Kort, and Ina M. Jürgenliemk-Schulz. Conventional, conformal, and intensity-modulated radiation therapy treatment planning of external beam radiotherapy for cervical cancer: The impact of tumor regression. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, 64(1):189–196, January 2006.
- [46] A.J. van der Kogel. *Late Effects of Radiation on the Spinal Cord: Dose Effect Relationships and Pathogenesis*. PhD thesis, Radiobiological Institute TNO, Univ. Amsterdam, Rijswijk, Netherlands, 1979.
- [47] Albert van der Kogel and Michael Joiner, editors. *Basic Clinical Radiobiology*. A Hodder Arnold Publication, 4th edition, May 2009.
- [48] H. Rodney Withers, Jeremy M.G. Taylor, and Boguslaw Maciejewski. Treatment volume and tissue tolerance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 14(4):751–759, April 1988.



Project co-funded by the European Commission within the FP7 (2007 – 2013)
Grant agreement no.: 228436

ULICE Union of Light-Ion Centres in Europe

Project type: Combination of CP & CSA
Integrating Activities / e-Infrastructures / Preparatory phase

Start date of project: 1st September 2009 Duration: 48 months

D.JRA 2.3 – Description of tasks with a proposal for potential structures for clinical research in ULICE
Delivery date: M18 2011/02/28

WP n° and title: WP 2 – Concepts and terms for dose volume parameters and for outcome assessment in hadron-therapy integrating applied biology, medical physics and clinical medicine in ULICE

WP leader: Ramona Mayer, Jacques Balosso

Reporting period: 1st

	Name	Partner	
Author(s):	Richard Pötter, Maximilian Schmid, Thomas Schreiner, Michael Baumann	MUW, MEDA, TUD	2011/02/28
Contributor(s):	Jacques Balosso, Guillaume Vogin	UCBL	
Pillar coordinator:	Richard Pötter	MUW	
Approved by TPB and CPO		signature	

Dissemination Level		
PU	Public	X
PP	Restricted to other programme participants (including the Commission Services)	
RE	Restricted to a group specified by the consortium (including the Commission Services)	
CO	Confidential, only for members of the consortium (including the Commission Services)	

TABLE OF CONTENTS

LIST OF ABBREVIATIONS AND DEFINITIONS	5
PUBLISHABLE SUMMARY	6
CONTENTS AND SPECIFIC DOCUMENT STRUCTURE	7
1 Background and introduction	7
2 Objectives and methodology	8
2.1 Clinical research methodology: comprehensive prospective data base orientated studies and phase I, II, III trials	8
2.2 Translational research methodology	9
2.3 Clinical and translational research scenarios for hadrontherapy	9
3 Structure and organisation	10
3.1 Disciplines participating in clinical and translational hadron therapy research	10
3.2 Research representatives	10
3.3 European Hadron Research Board and Executive Committee	10
4 Implementation and outlook	11
CONCLUSIONS	12
REFERENCES	13

LIST OF ABBREVIATIONS AND DEFINITIONS

ARCHADE	Advance Research Centre for HADron therapy in Europe located at Caen, France.
CERN	Conseil Européen pour la Recherche Nucléaire – European Council for Nuclear Research is the European Organisation for Nuclear Research and the world’s largest particle physics laboratory, situated in the Northwest suburbs of Geneva on the Franco-Swiss border, established in 1954. It was one of Europe’s first joint ventures and now has 20 Member States.
CNAO	Centro Nazionale di Adroterapia Oncologica – Italian National Centre for Hadron Therapy located at Pavia, Italy.
ENLIGHT	European Network for LIGHT ion Hadron Therapy is a multidisciplinary platform that aims at a coordinated effort towards ion-beam research in Europe.
ENVISION	European NoVel Imaging Systems for ION therapy is a four-year project set up by 17 leading European research organisations, including two leading European industrial partners founded by the European Commission within the Seventh Framework Programme.
ETOILE	Espace de Traitement Oncologique par Ions Légers Européen – French National Hadron-therapy Centre located at Lyon, France.
HIMAC	Heavy Ion Medical ACcelerator located at the National Institute of Radiological Sciences in Chiba, Japan.
HIT	Heidelberger Ionenstrahl-Therapiezentrum – Heidelberg Ion-Beam Therapy Centre located at the Heidelberg University Hospital, Germany.
NRoCK	Nordeuropäisches Radioonkologisches Zentrum Kiel – North European Radiooncological Centre Kiel located at the Medical University Centre Schleswig-Holstein, Germany.
ULICE	Union of Light-Ion Centres in Europe.
WP	Work-Package.

PUBLISHABLE SUMMARY

Hadron therapy including carbon-ion beam radiotherapy is being installed and is starting patient treatment during this decade in a considerable number of European centres and abroad. All carbon-ion therapy centres – as this form of treatment is regarded as experimental – and also a number of proton therapy centres will be interested in clinical research. In addition, many of these European projects are linked to academic institutions which are involved in high precision advanced photon radiotherapy development and (clinical) research.

This unique situation provides the unique chance to build up in parallel the required infrastructures and a comprehensive research structure and network, which may then become the basis for comprehensive and prospective multi-centre clinical research linked to physical/technological and biological translational research focussed on ion-beam therapy in Europe.

The main objective of such a research structure is to set up high-quality prospective clinical multi-centre research programmes targeting ion-beam radiotherapy in order to provide evidence regarding disease outcome and morbidity. Specific tools for designing, planning, performing, and evaluating such high-level research must be implemented which have then to be regarded as the basic framework for a comprehensive multi-centre research infrastructure (work-packages of ULICE).

Several clinical studies on various topics will have to be set up which comprise to compare the various effects of one dedicated radiation quality alone for protons, carbon ions, advanced photons and inter-compare also prospectively the effects of these different radiation qualities. In addition various strategies of combined treatment modalities will be investigated adding antineoplastic drugs and/or adding different forms of interventions (surgical procedures). Corresponding translational research settings in regard to physics/technology and biology are to be fully integrated into this clinical research scenario.

A Research Board is to be set up within ULICE, which comprises different different disciplines involved, the major (clinical) research groups (hadron therapy programmes) and facilities. The main tasks are to guide the design, implementation, operation, and continuous evaluation of database orientated clinical and translational research and multi-centre clinical phase I, II, III trials. A Research Board Executive Committee has to be additionally implemented for the regular and continuous operative activities in regard to the coordinated research efforts. The activities of this ULICE Research Board will furthermore have to be linked to relevant European clinical radiotherapy research organisations and networks.

CONTENTS AND SPECIFIC DOCUMENT STRUCTURE

1 Background and introduction

Hadrontherapy including carbon-ion radiotherapy is being installed and is starting patient treatment during this decade in at least six European centres according to available information at present: Heidelberg (HIT) 2010, Pavia (CNAO) 2011, Marburg 2012, Kiel (NRoCK) 2013, Caen (ARCHADE) 2015, Wiener Neustadt (MedAustron) 2015, Lyon (ETOILE) 2016. A growing number of facilities is also opening abroad, e. g. in Asia with Japan and China. Proton radiotherapy centres will also be opened during this period that will likely be at least as many as for carbon-ion centres, e. g. Essen, Dresden, Trento. All carbon-ion therapy centres – as this form of treatment is regarded as experimental – and likely also a considerable number of protontherapy centres will be interested in clinical research. In addition, many of these European hadrontherapy projects are linked to academic institutions which are involved in high precision advanced photon radiotherapy development and (clinical) research. Moreover, all these centres are linked by a common scientific network: ENLIGHT, created in 2002 at CERN.

This unique situation with several facilities setting into operation a new treatment modality step by step on a short time provides the unique chance to build up in parallel the required infrastructures together with a comprehensive research structure and network. This research structure should become the basis for prospective multi-centre clinical research. It should also be directly linked to physical/technological and biological translational research focussed on ion-beam therapy in Europe.

At the same time protontherapy is considered as a clear technical improvement of radiotherapy and the need for its assessment by phase III clinical trials is controversial. Conversely, carbon-ion therapy, due to its particular biological characteristics, could be considered as a completely new “Radiation Drug”, thus deserving a specific research methodology which will lead to results that have finally to be validated through high-level clinical evidence [1–4]. In particular, the clinical gain of carbon ions versus advanced photontherapy techniques and protontherapy is the question to answer that implies the involvement of protontherapy centres in clinical research. Actually, there is only a limited amount of studies available for hadrontherapy at present which provide such evidence, e. g. compare [5] for lung cancer. This obviously insufficient situation is an even stronger motivation for establishing an adequate and large research structure and network.

European Commission set up through the Seventh Framework Programme the frame for such research structure and network: the ULICE project. For this reason in ULICE work-package 2, a dedicated task is dealing with the “Design and Implementation of a Clinical Research Infrastructure in ULICE”. This first deliverable, i. e. “D.JRA 2.3 – Description of tasks with a proposal for potential structures for clinical research in ULICE”, contains:

- the description of the main tasks of this coordinated European research infrastructure;
- the outline of the potential structures which will be further specified, implemented, and evaluated during the course of ULICE according to the milestones and deliverables.

This progress goes along with the further evolution of the work-packages 3 to 7 of ULICE.

2 Objectives and methodology

The main objective is to set up high-quality prospective clinical multi-centre research programmes targeting ion-beam radiotherapy in order to provide evidence regarding disease outcome and morbidity. Specific tools for designing, planning, performing, and evaluating such high-level research must be implemented and they can be regarded as the basic framework for a comprehensive multi-centre research infrastructure. They have to include a consensus among the contributing partners on volumes and absorbed doses, specific radiobiological concepts, outcome assessment (WP 2.1), and the development of standard operating procedures for ion-beam therapy clinical research (WP 2.2).

In this context, ideally, several clinical studies on the following topics will have to be set up:

- to compare the various effects of one dedicated radiation quality alone:
 - protons,
 - carbon ions,
 - photons;
- to inter-compare prospectively the effects of carbon-ion radiotherapy, protontherapy, and advanced photontherapy;
- to compare various strategies of combined treatment modalities as hadrons/photons adding anti-neoplastic drugs and/or adding different forms of interventions (surgical procedures).

2.1 Clinical research methodology: comprehensive prospective data base orientated studies and phase I, II, III trials

It is well recognised in the international discussion on research in advanced radiotherapy including hadrontherapy that the classical research division into clinical phase I, II, III studies can only partially meet the needs for complex clinical radiation oncology research including translational biology and technological research. Historically, this classical clinical trial model has been established for drug research and it implies the development of a new drug within a long process in the laboratory and finally translating the laboratory findings into preclinical and then clinical phase I, II, III studies.

Radiation research implies the testing of the various forms of the complex “Radiation Drug” in experimental and clinical settings. The complexity of the clinical testing of this “Radiation Drug” itself is large, as the different variables as dose, volume, fractionation, and treatment time have finally to be tested in “phase I and II studies” as regard to tumour and normal tissue effects. As limited evidence for the effects of carbon-ion radiotherapy has been provided so far, this new “Radiation Drug” has to be regarded as widely unknown, except for some clinical scenarios and specific tumour entities, e. g. chordoma and chondrosarcoma at the skull base. This situation of “limited knowledge” implies that the major aim of the upcoming period should be to provide as many as possible valid, reliable, and reproducible clinical data for carbon-ion radiotherapy. This includes the investigation of diagnostic and treatment parameters and the link to the outcome of various disease sites and various normal tissue types. This approach represents an explorative and observational research scenario, which implies the accumulation of a large amount of data through the prospective and comprehensive collection of all available parameters. These data will come from (carbon-ion) radiotherapy, diagnostics and treatment planning for tumours and organs at risk as well as for tumour (pathology/biology) and patient characteristics, and data on outcome in regard to disease and morbidity. This type of research can be

efficiently linked to translational research questions from biology (e. g. prognostic or predictive markers or biological indicators like hypoxia) and also to research from technology (e. g. DVH parameters for the assessment of normal tissue effects).

For comparative research with other radiation qualities like protons and advanced photon technology it is consequently advantageous to extend such prospective comprehensive data collection on patients for specific disease sites and for specific organs at risk of particular interest as treated with protons and/or advanced photon technology. Such prospective comprehensive collection of data implies an upfront agreement on parameters which have to be assessed. When this large amount of data will reach a critical amount of information new relevant questions, not initially in mind, will be possibly raised and high-quality answers could be extracted from the data pool. Thus a real “data based oriented research” will be possible. In ULICE, this data collection tool is also addressed in work-package 7. This first exploratory research would then result in a generation of more advanced research hypotheses (e. g. comparisons based on equitoxic or equitumorcid effects) which will lead directly into the clinics (phase I, II, III) or which may ask for improvement of biology and/or technology parameters in the translational setting.

At present, it seems only possible to put forward some specific research questions in clinical scenarios which have already been widely investigated and where effects are well known and reported qualitatively and quantitatively. Under such conditions phase I and II studies on morbidity and effects and finally phase III studies, e. g. on the effects of dose escalation, seem to be appropriate. Such types of studies are being set up at present by the HIT facility in Heidelberg and the HIMAC facility in Japan for various research questions mainly in relation to the classical indications of neutron radiotherapy which had been (partly) already investigated for carbon-ion radiotherapy in Berkeley, Chiba, and Darmstadt.

2.2 Translational research methodology

Since there is an interactive relation between clinical radiation oncology and other science disciplines it is important to combine prospectively the clinical research setting with corresponding translational research settings in regard to physics/technology and biology. Such research settings are being installed for the various disciplines in the different work-packages of ULICE, in particular WP 3 for biology, WP 4 and 5 for medical physics/technology, WP 6 for accelerator physics, and WP 7 for grid infrastructure.

2.3 Clinical and translational research scenarios for hadrontherapy

The clinical (and translational) research scenario as needed within the specific research situation of hadrontherapy requests the following:

- observational studies on dose, volume, fractionation, treatment time linked to outcome with descriptive, hypothesis generating and testing elements;
- translational research (biology/technology) on specific questions and specific data cohorts within the observational studies;
- observational trials with defined parameters for comparable patient/tumour/OAR cohorts
 - treated with photon, proton, and carbon-ion radiotherapy,

- treated with additional anti-neoplastic drugs,
- treated with different forms of interventions;
- prospective interventional clinical trials (hypothesis driven), i. e. phase I, II, III studies.

3 Structure and organisation

3.1 Disciplines participating in clinical and translational hadron therapy research

To translate such clinical (and translational) research scenarios into clinical practice, first of all the different disciplines in charge of the various specialities have to be defined:

- radiation oncology specialists: carbon ion, proton, and advanced photon radiotherapy;
- translational research specialists: tumour and normal tissue radiobiology, medical radiation physics, imaging;
- cancer diagnosis specialists: pathology, radiology, nuclear medicine;
- medical oncology specialists: anti-neoplastic drugs;
- organ specialists: various disease sites, combined treatment, and OAR assessment;
- clinical trial specialists: methodologists, statistician, data manager, clinical research technician, study nurse, quality assurance;
- basic physics and technology specialists: beam diagnostic and control, quality assurance, radiation protection.

3.2 Research representatives

Such structures for clinical research will systematically include the following representatives:

- clinical representatives from the radiotherapy facilities including carbon ions, protons, and advanced photons;
- representatives from major hadrontherapy orientated research groups, e. g. ENVISION and ULICE;
- representatives from the major research disciplines, e. g. radiation oncology (hadrons/photons), medical radiation physics, radiobiology, imaging, pathology, medical oncology, organ oriented disciplines, statistics;
- representatives from the organ orientated clinical research groups (hadrontherapy) e. g. neuro-oncology, head & neck oncology, thoracic oncology, uro-oncology.

3.3 European Hadron Research Board and Executive Committee

For the implementation of such an ambitious programme specific responsibilities will have to be defined. A Research Board is to be set up within ULICE, at first, which comprises the different disciplines, clinical research groups and facilities. This board would have the following tasks:

- to guide the design, implementation, operation, and continuous evaluation of the prospective multi-centre data base for patients treated with carbon ions, protons, and advanced photons techniques;
- to guide the design, operation, and outcome of data base orientated research;
- to design and to follow up multi-centre phase I, II, III clinical studies.

A mechanism has to be defined on the link and the mutual responsibilities between this Research Board on the one hand and the hadron facilities, the task orientated research groups, the research disciplines, and the organ orientated research groups on the other hand. If a large comprehensive Research Board is decided upon with mainly strategic responsibilities, in addition a Research Board Executive Committee has to be implemented for the regular and continuous operative activities in regard to the coordinated research efforts. The activities of this ULICE Research Board will furthermore have to be linked to relevant European clinical radiotherapy research organisations and networks on the international, national, and regional level in member states focussing on hadron and advanced photon radiotherapy research.

4 Implementation and outlook

The proposed research structure for ion-beam therapy will be presented and discussed in ULICE during the upcoming months. The mission is to agree with the involved parties upon the overall concept which has to be detailed and to find a common implementation strategy. The first practical steps are going to take place during 2011 followed by the operation start-up of the research structure with putting up an European Hadron Research Board supported by an Executive Committee from 2012 onwards. A challenge for the future will be to maintain this structure on an European scale, since this type of tool needs a continuous effort of implementation and a large financial support.

CONCLUSIONS

In this deliverable on hadrontherapy research tasks and structure it was possible to precise the background for future hadrontherapy research which provides at present the unique historical opportunity for the upcoming research objectives and structures which were defined accurately. These research objectives comprise various (specific) forms of clinical and translational research which need major extra efforts for successful implementation: data base orientated research and hypothesis driven clinical trial research. Sustainable structures necessary for continuous planning and performing these types of hadrontherapy research were elaborated.

The first steps will be taken by creating a strategic and operational research infrastructure within ULICE including a Research Board and an Executive Committee representing the different disciplines and research groups. The programme for research as outlined in this deliverable will have to be agreed upon within ULICE as soon as possible. Then first steps have to be taken for putting this programme into operation within the frame of ULICE.

REFERENCES

- [1] Søren M. Bentzen. Randomized controlled trials in health technology assessment: Overkill or overdue? *Radiother Oncol*, 86(2):142–147, February 2008.
- [2] Michael Brada, Madelon Pijls-Johannesma, and Dirk De Ruyscher. Current clinical evidence for proton therapy. *The Cancer Journal*, 15(4), 2009.
- [3] Herman Suit, Hanne Kooy, Alexei Trofimov, Jonathan Farr, John Munzenrider, Thomas DeLaney, Jay Loeffler, Benjamin Clasié, Sairos Safai, and Harald Paganetti. Should positive phase III clinical trial data be required before proton beam therapy is more widely adopted? No. *Radiother Oncol*, 86(2):148–153, February 2008.
- [4] Herman Suit, Thomas DeLaney, Saveli Goldberg, Harald Paganetti, Ben Clasié, Leo Gerweck, Andrzej Niemierko, Eric Hall, Jacob Flanz, Josh Hallman, and Alexei Trofimov. Proton vs carbon ion beams in the definitive radiation treatment of cancer patients. *Radiother Oncol*, 95(1):3–22, April 2010.
- [5] Madelon Pijls-Johannesma, Janneke P.C. Grutters, Frank Verhaegen, Philippe Lambin, and Dirk De Ruyscher. Do we have enough evidence to implement particle therapy as standard treatment in lung cancer? A systematic literature review. *Oncologist*, 15(1):93–103, January 2010.



Project co-funded by the European Commission within the FP7 (2007–2013)

Grant agreement no.: 228436

ULICE

Union of Light Centres in Europe

Project type: Combination of CP & CSA
Integrating Activities / e-Infrastructures / Preparatory phase

Start date of project: 1st September 2009 Duration: 48 months

D-JRA 2.5 - Harmonisation and recommendations for prescribing and reporting absorbed doses and dose-volume histograms based on 3D and 4D concepts

Delivery date: (month 36) 2012/08/31

WP2 – Concepts and terms for dose volume parameters and for outcome assessment in hadron-therapy integrating applied biology, medical physics and clinical medicine in ULICE

WP leader: Ramona Mayer, Jacques Balosso

Reporting period: 3rd

	Name	Partners	2012/08/31
Author(s):	Jacques Balosso, André Wambersie,	UCBL MUW	
Contributor(s):	Gauthier Bouilhol, David Sarrut, Guillaume Vogin, Giulio Magrin, Piero Fossati,	UCBL, MEDA, CNAO	
Pillar coordinator:	Richard Pätter	MUW	
Approved by TPB and CPO		signature	

Dissemination Level		
PU	Public	ⓘ
PP	Restricted to other programme participants (including the Commission Services)	
RE	Restricted to a group specified by the consortium (including the Commission Services)	
CO	Confidential, only for members of the consortium (including the Commission Services)	

TABLE OF CONTENTS

LIST OF ABBREVIATIONS AND DEFINITIONS	4
PUBLISHABLE SUMMARY	8
1 HARMONISATION IN THE EXCHANGE OF CLINICAL INFORMATION (WITH SPECIAL REFERENCE TO ION-BEAM THERAPY)	9
1.1 Introduction	9
1.2 Brief summary of patient history	9
1.3 Staging	9
1.4 Evaluation of treatment outcome	9
2 VOLUME CONCEPTS IN ONCOLOGY AND RADIATION THERAPY	10
2.1 Introduction	10
2.2 General oncological volume concepts	10
2.2.1 Gross tumor volume(s), GTV	10
2.2.2 Clinical target volume (CTV)	11
2.3 Radiation therapy volume concepts	12
2.3.2 The Planning Target Volume	13
2.4 Normal tissue related volume concepts	14
2.4.1 Introduction into treatment related morbidity and Quality of Life in oncology	14
2.4.2 Organs at Risk (OARs)	14
2.4.3 Remaining volume at risk (RVR) and OARs	15
3 BIOLOGICALLY WEIGHTED ABSORBED DOSE: EQUIEFFECTIVE, ISOEFFECTIVE AND EQDX DOSE CONCEPTS AND FORMALISM	15
3.1 From (physical) absorbed dose to biologically transformed ("bioeffective") absorbed dose	15
3.2 The equieffective absorbed dose concept	16
3.2.1 Definition	16
3.2.2 Selection of the reference conditions for comparison	16
3.3 The isoeffective absorbed dose concept	19
3.4 The EQD2 and EQDXα/β concepts	19
3.4.1 Definition	19
3.4.2 Possible extension of the EQD2 to the EQDX α/β formalism	19
3.5 Application of the equieffective and isoeffective absorbed dose concepts to the different radiation therapy techniques	20
3.5.1 Fractionated Photon-Beam Therapy	20
3.5.2 Proton-Beam Therapy	21
3.5.3 Carbon-Ion (12C) Beam Therapy	21
4 RADIATION QUALITY, MICRODOSIMETRY AND RELATIVE BIOLOGICAL EFFECTIVENESS (RBE)	22
4.1 The RBE concept	22
4.2 Definition of RBE	23

4.3	Reference radiation quality	23
4.4	Review of available microdosimetric data	23
5	REPORTING DOSE AT SELECTED (REFERENCE) POINT(S) AND /OR DOSE-VOLUME HISTOGRAMS	27
5.1	Introduction	27
5.2	Selection of reference points for prescribing and reporting	27
5.3	Dose-volume histograms (DVH) and selection of dose values on the DVH curve for prescribing and reporting	29
5.4	Recommendations for reporting doses and dose distributions in ion-beam therapy	33
5.5	Quantities, units and symbols	34
6	SPECIFIC ISSUES RELATED TO 4D REPORTING	34
6.1	Background	34
6.1.1	Image-acquisition limitation	35
6.1.2	CTV–PTV margins	35
6.1.3	RT delivery deviations (photontherapy)	36
6.2	Photon therapy practice	36
6.2.1	Motion-encompassing methods	36
6.2.2	Respiratory gating methods	37
6.2.3	Breath-hold methods	38
6.2.4	Forced shallow breathing with abdominal compression	38
6.2.5	Real-time tumor-tracking methods	38
6.3	Particle therapy specific issues	39
6.3.1	Beam scanning.	39
6.3.2	Passive scattering	40
6.4	Motion management and technological solutions (JRA.WP4)	40
6.4.1	Separating tumors according to the importance of motion	40
6.4.2	Gating for reducing the motion amplitude	40
6.4.3	Apply adapted margins	41
6.4.4	Beam scanning:	42
6.4.5	ULICE-WP4 contribution	42
6.5	Recommendations for prescribing and reporting	43
	CONCLUSION	44
	REFERENCES	46

LIST OF ABBREVIATIONS AND DEFINITIONS

α/β	The ratio of the two parameters defining the radiobiological characteristics of a tissue according to the linear quadratic model: $s = e^{-(\alpha d + \beta d^2)}$
AJCC	American Joint Committee on Cancer is an organisation best known for defining and popularising cancer staging standards.
BED	Biologically Effective Dose, the equieffective dose delivered using absorbed doses per fraction approaching zero Gy.
BIPM	Bureau International des Poids et Mesures (International Office of Weights and Measures) is an international standards organisation established to maintain the International System of Units (SI) under the terms of the Metre Convention.
CT	Computed Tomography, CT = CTscan.
CTV	Clinical Target Volume is a volume of tissue that contains a demonstrable GTV and/or subclinical malignant disease at a certain probability considered relevant for therapy.
D	Absorbed dose is a measure of the energy deposited per unit mass of medium by ionising radiation, and so has the unit Gy.
D02; D98; D50	Laterally the maximal dose received by respectively 2%; 98% and 50% of the defined target volume (usually the PTV).
3D	Three (geometrical) dimensions.
4D	The three geometrical dimensions plus the time.
3D-CRT	Three dimensions conformal radiation therapy, the basic present state of photon radiotherapy allowing a true 3D handling of the dose distribution.
DIBH	Deep-inspiration breath-hold
$D_{\text{EquiE}} ; D_{\text{IsoE}}$	Equieffective / Isoeffective dose is the absorbed dose that delivered under the reference conditions / the conventional conditions (2Gy per fractions, 5 fractions a week with X ray) would produce the same biological effect in a given system as the actual treatment, all other conditions being the same.
Dref	Dose of the reference radiation quality selected for the definition of the RBE.
DRR	Digitally reconstructed radiograph
Dtest	Dose of the test radiation quality used for the definition of the RBE.
DVH	Dose-Volume Histogram is a concept used in radiation treatment planning to figure the relation between dose heterogeneity and organ volumes.
EBRT	External Beam Radiation Therapy.
EORTC	European Organization for Research and Treatment of Cancer

EQDX	Equieffective dose to a reference dose delivered in fractions of X Gy per fraction, for example, EQD2 is the equieffective dose in 2-Gy fraction (the “classical” reference dose).
Exhale	Resting expiratory level
FB	Free breathing
FDG	Fluorodeoxyglucose is a radiopharmaceutical used in PET imaging.
FIGO	International Federation of Gynaecologic Oncology
fMRI	functional Magnetic Resonance Imaging is a type of specialised MRI scan measuring the hemodynamic response (change in blood flow) related to neural activity.
Gate	A device that (for this application) restricts image acquisition or treatment delivery to a particular part of the respiratory cycle
GEC-ESTRO	GEC-ESTRO was founded in 1990 from the amalgamation of The Groupe European de Curiethérapie – GEC - (European Group of Brachytherapy) and the European Society for Therapeutic radiology and Oncology (ESTRO).
GSI	Gesellschaft für SchwerIonenforschung – Centre for Heavy Ion Research located at Darmstadt, Germany
GTV	Gross Tumor Volume is the gross demonstrable extent and location of a tumor. One can define also GTV-T, GTV-N, GTV-M considering respectively the tumor, the regional lymph nodes and the metastatic spreading of the tumor.
Gy	Gy is the symbol of gray, the name of the special unit of absorbed dose of ionising radiation, i. e. the absorption of one joule of ionising radiation by one kilogram of matter.
HIMAC	Heavy Ion Medical ACcelerator located at the National Institute of Radiological Sciences in Chiba, Japan.
HIT	Heidelberger Ionenstrahl-Therapiezentrum – Heidelberg Ion-Beam Therapy Centre located at the Heidelberg University Hospital, Germany.
HVL	Half attenuation value layer
IAEA	International Atomic Energy Agency
ICRP	International Commission on Radiological Protection is an advisory body providing recommendations and guidance on radiation protection.
ICRU	International Commission on Radiation Units and Measurements is a standardisation body set up in 1925 by the International Congress of Radiology.
IMPT	Intensity Modulated Particle Therapy.
IMRT	Intensity-Modulated Radiation Therapy is an advanced type of high-precision radiation therapy technique using X ray (photons).
Inhale	Resting inspiratory level
Interfraction	Occurring between treatment sessions
Intrafraction	Occurring within a treatment session

ITV	Internal Target Volume is defined as the CTV plus a margin which takes into account uncertainties in size and shape of the CTV and its position/movements within the patient.
LET	Linear Energy Transfer is a measure of the energy transferred to material as an ionising particle travels through it.
MRI	Magnetic Resonance Imaging is a medical imaging technique using a powerful magnetic field.
MV; MeV; Mev/u	Mega volt; Mega electron volt; Mega electron volt per nucleon (unit of atomic mass) are energy units for beams and nuclear particles.
NIRS	National Institute of Radiological Sciences located at Chiba, Japan
OAR	Organ At Risk or critical normal structures are tissues, which if irradiated could suffer significant morbidity, and thus might influence the treatment planning and/or the dose prescription.
PET	Positron Emission Tomography is a medical imaging technique using pairs of gamma rays emitted indirectly by a positron-emitting radionuclide.
PET-CT	Positron Emission Tomography and Computed Tomography is a medical imaging device which combines in a single gantry system both a PET and a CT (also PETscan).
Phase	A particular stage in a periodic process (e.g., regular respiratory motion)
PRV	Planning Organ at risk Volume is, in analogy with the PTV, a geometrical concept considering uncertainties and variations in the position of organs at risk during treatment.
PTV	Planning Target Volume is a geometrical concept introduced for treatment planning and evaluation. It is the recommended tool to shape dose distributions to ensure that the prescribed dose will actually be delivered to all parts of the CTV, with a clinically acceptable probability, despite geometrical uncertainties such as organ motion and setup variations. It is used for dose prescription and reporting.
R0	Surgical resection with zero microscopic residual tumor, this suppose that the resection is large enough around the GTV, recommendations are existing for each clinical situation.
R1	Surgical resection with microscopic, but not macroscopic (with is R2), residual tumor as seen by the pathologic microscopic examination of the resected material;
RBE	Relative Biological Effectiveness is defined as the ratio of a dose of a reference radiation quality to the dose of the test radiation quality required to cause the same biological level of effect, all other conditions being the same.
Respiratory gated	The synchronization of imaging and radiation delivery with respiration, such that image acquisition/radiation delivery only occurs during a certain part of the respiratory cycle
Respiratory synchronized	The synchronization of radiation delivery with respiration via movement of the linear accelerator or the patient such that the radiation beam is following the tumor during treatment
RT	Radiotherapy or radiation therapy.
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group, one of the main cooperative group for advance in radiotherapy in USA
RVR	Remaining Volume at Risk is the volume that is within the imaged region of the patient, and outside all delineated OARs and CTVs.

SOPB	Spread-Out Bragg peak is an overlap of several pristine Bragg peaks at staggered depths.
T1/2	Literally the half live, considering tumor growth it is about the doubling time of the tumor.
TNM	Classification of Malignant Tumours is a cancer staging system that describes the extent of cancer in a patient's body. T describes the size of the tumour and whether it has invaded nearby tissue; N describes regional lymph nodes that are involved; M describes distant metastasis (spread of cancer from one body part to another).
TPS	Treatment Planning System used in radiation therapy for planning the doses in the tumour and the surrounding healthy tissue (critical organs).
TV	Treated Volume is the volume of tissue that receives at least the dose spred specified by the radiation oncologist in charge of the patient and considered as appropriate to achieve the goal of the treatment within the bounds of acceptable complications.
WP	Working Package

PUBLISHABLE SUMMARY

A useful exchange of information in cancer therapy implies an harmonisation in the exchange of the relevant clinical information. This exchange of information is essential for any progress in cancer therapy, in particular to compare the efficacy of different types of treatment.

It implies the harmonisation on the definitions of clinical and technical concepts and terminology at a broad, ideally international level.

The cancer treatment *modalities* include surgery, radiation therapy and medical treatment. Each of these modalities is applied using different *technical approaches* (e.g., in radiation therapy: photons, ions-beams, 3D-CRT, IMRT, brachytherapy, etc.).

The overall treatment strategy is decided jointly by representatives of these disciplines i.e., the oncology-therapy team responsible for the protocols. For the radiation part of the treatment, the prescription and reporting are the responsibility of the radiation oncologist in charge of the patient. In addition, in radiation therapy, close collaboration between the medical, physics and technical teams is essential.

For new techniques such as proton and carbon-ion therapy, exchange of information is essential in order to optimize the treatment outcomes and reduce the risk of complications. A useful exchange implies reporting the treatments in a harmonized way.

International staging methods should be used to evaluate the initial extent of the disease in order to avoid recruitment bias, and scoring systems recommended by international organizations should be used to ensure harmonization in evaluation of clinical outcomes (therapeutic success or side effects).

1 HARMONISATION IN THE EXCHANGE OF CLINICAL INFORMATION (WITH SPECIAL REFERENCE TO ION-BEAM THERAPY)

1.1 Introduction

A useful exchange of information in cancer therapy implies an harmonisation in the exchange of the relevant clinical information. This exchange of information is essential for any progress in cancer therapy, in particular to compare the efficacy of different types of treatment.

It implies the harmonisation on the definitions of clinical and technical concepts and terminology at a broad, ideally international level.

The cancer treatment *modalities* include surgery, radiation therapy and medical treatment. Each of these modalities is applied using different *technical approaches* (e.g., in radiation therapy: photons, ions-beams, 3D-CRT, IMRT, brachytherapy, etc.).

The overall treatment strategy is decided jointly by representatives of these disciplines i.e., the oncology-therapy team responsible for the protocols. For the radiation part of the treatment, the prescription and reporting are the responsibility of the radiation oncologist in charge of the patient. In addition, in radiation therapy, close collaboration between the medical, physics and technical teams is essential.

For new techniques such as proton and carbon-ion therapy, exchange of information is essential in order to optimize the treatment outcomes and reduce the risk of complications. A useful exchange implies reporting the treatments in a harmonized way.

International staging methods should be used to evaluate the initial extent of the disease in order to avoid recruitment bias, and scoring systems recommended by international organizations should be used to ensure harmonization in evaluation of clinical outcomes (therapeutic success or side effects) [ICRU, 2010].

1.2 Brief summary of patient history

A brief summary of the patient history should be reported containing the relevant aspects which are needed to understand and interpret the selection of the treatment strategy and the outcome of the treatment.

This becomes more and more important due to the increasing complexity of the treatments (in particular combination of different modalities and techniques).

1.3 Staging

Reporting initial staging is important to avoid a bias in patient recruitment.

Staging should follow the international staging systems, e.g. [AJCC 2010].

Evaluation of the situation may be repeated during the course of a combined complex treatment comprising different techniques (this could be the case e.g., at the beginning of an ion boost).

1.4 Evaluation of treatment outcome

Treatment outcomes should be evaluated applying international scoring systems, e.g., EORTC-RTOG [Cox, 1995] for assessing and comparing local control rates, normal tissue complications and quality of life.

2 VOLUME CONCEPTS IN ONCOLOGY AND RADIATION THERAPY

2.1 Introduction

Harmonisation in prescribing and reporting a radiation treatment cannot be achieved without an agreement on the volume concepts and terminology. The different relevant volumes have been described in successive ICRU reports for external beam therapy [ICRU 1993, 1999, 2004, 2007, 2010]. They are included and their application in ion-beam therapy is discussed in the previous [ULICE 2011]. The present draft is largely based on recommendations included in the three last ICRU reports [ICRU 2007, ICRU 2010, ICRU 2012].

The different volumes relevant in radiation therapy can be presented in three groups:

- general oncology volume concepts
- radiation therapy concepts
- normal tissue related volumes

The general oncological concepts include the gross tumor volume (GTV) and clinical target volume (CTV). The GTV and CTV are volumes with proven (GTV) or suspected (CTV) cancer involvement. Their definition and delineation are based on general clinical oncological principles and are thus independent from the treatment modality or strategy. They are virtually applicable to all modalities of cancer therapy.

In the second group, the radiation-oncology volumes depend largely on technical aspects of the radiation techniques: planning target volume (PTV), internal target volume (ITV), treated volume, reference volume(s). The most critical aspects of this group are the movement and the uncertainties of position of the volume thus introducing the time along with the 3 geometrical dimensions: 4D concepts.

The third group of volumes is related to the normal tissue tolerance, i.e., organs at risk (OAR), planning organ at risk volumes (PRV) and remaining volumes at risk (RVR).

This approach is in line with the growing tendency of "comprehensive cancer diagnosis and treatment" combining the different diagnostic and therapeutic strategies and modalities (surgical, medical and radiation therapy) based on comprehensive multidisciplinary disease and risk assessment. The final aim is to use a comprehensive approach to control the disease in the GTV and the overall CTV (local, regional and distant spread) taking into account adverse side effects and impairment in quality of life.

Some common terminology and concepts have to be agreed upon among the different treatment disciplines usually within the setting of regular multidisciplinary tumor boards (e.g. , patient staging, joint decision making on treatment strategy, treatment monitoring, evaluation of outcome, etc).

Delineation of the CTV, PTV and OAR is a medical decision of the radiation oncologist, which results from a clinical judgment involving many factors. 3D imaging, selection and delineation of the GTV, CTV and OAR are crucial steps in a chain starting with the decision to treat the patient with radiation therapy and ending with the response evaluation and the follow-up in search of recurrence and treatment-induced morbidity. The specific input of the 4D concepts discussed in section 6.

2.2 General oncological volume concepts

2.2.1 Gross tumor volume(s), GTV

The Gross Tumor Volume (GTV) is the gross demonstrable extent and location of the tumor at diagnosis, before any treatment. It may consist of a primary tumor (primary tumor GTV or GTV-T), metastatic regional node(s) (nodal GTV or GTV-N), or distant metastasis (metastatic GTV, or GTV-M).

In case of post-operative irradiation after assumed complete surgical resection (R0 or R1 resection), there is no GTV to define, and only a CTV needs to be delineated. This comment also applies for the resection of metastatic regional nodes.

There are several reasons to describe and report the GTV in a complete and accurate way. Firstly, it is required for staging, *e.g.* according to the FIGO and/or the TNM system [AJCC 2010]. Secondly, an adequate dose must be delivered to all parts GTV to obtain tumor control. Thirdly, evaluation of the regression of the GTV and resulting alteration of the position of the normal tissues is needed for redefining the CTV and the PTV during the course of (a combined) treatment. Fourthly, changes of the GTV during treatment may be predictive of treatment outcome and thus analyzed carefully.

The method(s) used to delineate the GTV have to be specified and reported because different examination methods may come out with different results.

The use of functional imaging with positron emission tomography (PET) using various tracers or with functional MRI (fMRI) can add functional aspects to the delineation of the GTV, *e.g.*, hypoxic region, proliferative zone (developed in WP 2.7 deliverable). Repetitive imaging indicating the change in functional (sub)-GTV during the course of a treatment may bring useful information. From a therapeutic point of view, it can be used to identify sub-GTVs that should receive some additional dose [Ling, 2000].

For reporting the GTV, the following parameters should be indicated:

- anatomical location, extent, volume and dimensions (three orthogonal dimensions).
- technique(s) used for evaluation.
- time when evaluation was made (in relation to the start of the treatment or absorbed dose delivered).
- information about subvolumes (if relevant).

2.2.2 Clinical target volume (CTV)

Definition

The Clinical Target Volume (CTV) is a volume of tissue that contains a demonstrable GTV and assumed subclinical malignant disease at a certain probability considered to require therapy to achieve the treatment aim. Following surgical resection, the CTV may contain only sub-clinical disease.

The treatment aim is cure or palliation and always includes considerations in regard to treatment related adverse side effects and impairment in Quality of Life. The type of malignancy, the potential of combined treatment strategies, the consequence of loco-regional failure and the expected feasibility of salvage treatment need to be considered for defining the CTV especially the CTV planned for radiotherapy. This remains a clinical judgment

The notion of subclinical malignant disease takes into account:

- for radiotherapy and for surgery:

- the microscopic tumor spread at the boundary of the primary tumor GTV (a kind of "shell" outside of what can be observed, palpated, or visualized on a particular imaging modality) *i.e.*, CTV-T. This factor is particularly relevant in ion-beam therapy.
- the possible regional infiltration into lymph nodes (CTV-N), and the microscopic tumor spread around a macroscopically involved node.

-for systematic treatment:

The potential metastatic involvement of other organs needs also to be considered which may also include a certain site for radiotherapy (*e.g.*, brain), despite their normal appearance on clinical and radiological examinations (CTV-M).

Delineation of the CTV

The CTV concept may be very different between highly malignant (aggressive) and slowly (moderately) infiltrating tumors.

The selection of the tissues that bear risk for microscopic infiltration outside of the GTV is a probabilistic assessment integrating the biological and clinical behavior of the various tumor entities, and the knowledge of the surrounding anatomy, including structures that are barriers to tissue infiltration or on the contrary, by tissues that are easy conduits for tumor dissemination (*e.g.* fatty tissue).

By definition, each malignant tumor GTV should be associated with a CTV. As mentioned above and depending on the conditions, the size of the CTV results from the selection of a large or a narrow safety margin, or in some cases no margin at all. When several CTVs are selected, it is recommended that an unambiguous terminology corresponding to the GTV denomination be used. This is especially the case when a boost is used after a large delineated CTV [ICRU 2007].

Definition of the CTV(s) is in principle the joint responsibility of the comprehensive oncology team including surgery, medical and radiation treatment modalities. Delineation of the radiotherapy CTV(s) is the responsibility of the radiation oncologist (or team) in charge of the patient. It is currently based on personal clinical experience; experience accumulated in the department, exchanged and published information. It is an important step in the treatment prescription together with the selection of the absorbed dose, which can be expressed in terms of DVH and/or absorbed dose to agree upon reference points. For quantitative margin definition and future research, it would be advantageous to introduce a probabilistic definition, *e.g.*, to choose the CTV based on a defined probability of containing clonogenic cells that need to be treated [ICRU 2010].

Risk-related CTV

The probability of presence of malignant cells and their density in the safety margin around the GTV decreases with the distance from the border of the GTV. The malignant cell density is the highest at the border of the GTV and is expected to decrease (in principle) down to close to zero at the external border of the CTV (i.e., external border of the safety margin). Therefore, and because of the related risk of recurrence, the concepts of risk related CTVs have been introduced [ICRU 2012]. One practical consequence is that different dose levels may be prescribed to high and low-risk CTVs.

The assessment of risk may be not only related to the assumed cell density at diagnosis but may be also related to the response to treatment. This approach has been used *e.g.* in Hodgkin's disease, small cell lung cancer, anal cancer and head and neck cancer since long with applying a boost treatment to residual macroscopic GTV.

Reporting the CTV

Following parameters should be reported:

- The anatomical location, extent, volume and dimensions (three orthogonal dimensions).
- Specification of the corresponding GTV (if relevant)
- Identification of high and low risk CTV(s)
- The time when evaluation was made (in relation to the start of the treatment or absorbed dose delivered).

2.3 Radiation therapy volume concepts

2.3.1 Introduction

The recent developments in defining concepts and terminology for reporting volumes [ICRU 2007, ICRU 2010, ULICE 2011] reflect the growing importance of progress in radiation oncology and multimodality into general oncological and radio-oncological assessment and treatment. Specific radiation oncology volumes need to be considered separately as tools to achieve the radiation therapy objectives in the context of the overall strategy.

In the previous sections, general oncological and radiation oncology concepts were considered as applicable to any kind of cancer treatment strategy using surgery, radiation therapy and/or medical/chemo-therapy. The different modalities may be applied simultaneously and/or successively: the tumor response or tolerance to one treatment modality may influence the selection and parameters of the following treatment modality.

The present section deals with concepts related to radiation oncology. The global treatment prescription includes the place of radiotherapy within the multimodality oncological strategy, *e.g.* radical/(neo-)adjuvant, simultaneous/successive anti-neoplastic drugs. The prescription of radiotherapy implies the definition of all

CTVs that should be irradiated, their extent and location and also the dose and fractionation and the dose distributions.

2.3.2 The Planning Target Volume

Within the frame of the global (multimodality) anti-cancer strategy, the specific goal of the radiation-therapy contribution to the treatment is to deliver the prescribed dose to every CTV selected for radiation therapy,

To achieve this goal, a volume - the Planning Target Volume (PTV) - is defined as the volume planned to be irradiated at the appropriate dose in order to ensure that all parts of the CTV(s) receive the prescribed dose.

The Planning Target Volume (PTV) is defined as the volume that includes the CTV and a margin that accounts for organ motion and geometrical uncertainties in dose administration. The PTV may be (much or slightly) larger or even equal to the selected CTV that ensures that the entire volume receives the prescribed dose with the clinically accepted probability.

The PTV is thus a geometrical concept introduced for treatment planning, dose prescription, dose volume reporting and evaluation. For external beam therapy it is the recommended tool to shape dose distributions to ensure that the goal of the radiation treatment will actually be reached despite geometrical uncertainties such as organ motion and setup variations [ICRU 2007].

There is thus a PTV each time radiotherapy of a CTV is planned for curative, postoperative or palliative intent. However, depending on the technique, the approach to delineate the PTV, its size and shape may be very different. Unlike the volume concepts for GTV and CTV, the radiotherapy PTV depends, to a large extent, on the treatment conditions and technical possibilities of radiotherapy. Depending on the global treatment strategy there can be one or several PTVs irradiated simultaneously or successively.

The concept of Planning Target Volume (PTV) was initially introduced for external photon-beam therapy in [ICRU 1993]. It was developed and slightly adapted in successive ICRU Reports [ICRU 1999; ICRU 2004; ICRU 2007, ICRU 2010]

The delineation of a PTV has to take into account essentially two types of uncertainties:

- (1) Size and shape of the CTV and its position or movements within the patient,
- (2) Irradiation delivery that depends largely on the irradiation technique.

The margin that takes into account the first set of uncertainties surrounds the CTV in external beam therapy like a shell : it is called the "internal margin" and defines the Internal Target Volume (ITV). The second set of uncertainties related to the beam delivery conditions leads to the definition of the "set-up" or "external margin"; it is applicable to any kind of radiation. In particular for particle therapy uncertainties in particle range have to be taken into account. The ITV concept may be useful mainly in clinical situations where uncertainty about the position or movement of the CTV dominates over set-up uncertainties and/or when they are independent.

The combination of these two types of margins around the CTV forms the planning target volume (PTV). In ICRU Report 62 (ICRU, 1999), it was recommended that for external beam radiotherapy internal and set-up margins should be added quadratically (because the two sources of uncertainties are independent, ICRU 62 p11 [ICRU 1999]). More generally this allows adding any kind of independent uncertainties whatever their origins.

A specific PTV is defined for a CTV treated by a given type of irradiation technique. Consequently, when different types of radiations are applied, as many PTVs need to be defined for the same CTV, e.g., IMRT combined with (one or multiple) beams of ions.

Reporting the PTV

The PTV should be reported in such a way that one could reproduce exactly the treatment.

The report should include the specification of the corresponding CTV (and GTV if relevant).

For particle-beam therapy, two types of (set-up) uncertainties have to be taken into account: those related to the beam-CTV positioning and those related to particle range. They could theoretically be added resulting in a kind of combined shell around the CTV. However their computation may rise difficulties related to algorithms abilities as mentioned in ICRU 78 p86 [ICRU 2007].

2.4 Normal tissue related volume concepts

2.4.1 Introduction into treatment related morbidity and Quality of Life in oncology

Treatment related morbidity and associated impairment in quality of life are essential issues to be taken into account in cancer treatment and relate to any treatment modality alone, e.g., surgery, radiotherapy, or anti-neoplastic/targeted drug treatment or any combination of them. There are typical patterns of early and/or late morbidity associated with any of these treatment modalities. These may interact and can be increased when combining these modalities [ICRU 2012].

Hence, the decision on a treatment strategy must be based on balancing the curative potential of each modality and the probability of inducing early or late adverse side effects, based on the available evidence.

2.4.2 Organs at Risk (OARs)

The organs at risk (OAR) or critical normal structures are tissues, which if irradiated could suffer significant morbidity, and thus do influence the treatment planning and/or the dose prescription [ICRU 2010]. In principle, all non-target tissues could be considered organs at risk, if they have impact on treatment and outcome. However, normal tissues considered as OARs typically depend on the location of the CTV/PTV and/or the prescribed dose.

It will be essential for future clinical research and practice to define and differentiate the different biological targets (volumes/points) for different functional and/or morphological endpoints and their associations with the dose-volume relations. This is important when different radiotherapy techniques (3D photons, IMRT, ions) are combined with their different targets and dose distributions.

The appropriate dose-volume constraints in the OAR will evolve further with time based on clinical research and based on further understanding of underlying biological mechanisms through experimental research. Such progress will be associated with the development of experimental, (bio-) imaging and treatment techniques.

For external beam therapy, the concept of the Planning organ at risk volume (PRV) has been developed [ICRU 1998, ICRU 2004, ICRU 2007, ICRU 2010] which implies shell margins that have to be added to the OARs to compensate for variations and uncertainties, using similar principles as for the PTV. A margin around an Organ at Risk with a serial-like structure (e.g., *rectum* where the maximum dose to a small circumferential volume determines tolerance) is more clinically relevant than around Organs at Risk with parallel-like structure (e.g. liver, lung, parotid). For organs with parallel-like structure, it is more important to delineate the whole organ, since tolerance depends more on the percent of the whole organ volume irradiated.

For reporting OAR dose in EBRT, ICRU report 83 recommended that, similar to the PTV, the PRV be described by including the size of the margins applied to the Organ at Risk in different directions. As for the PTV, several authors have proposed approaches to calculate the OAR-PRV margins on the basis of systematic and random uncertainties [Mc Kenzie, van Herk (ICRU Report 83)].

A margin concept for OAR dose assessment has been implemented at specific organ sites, e.g. the spinal cord in head and neck radiotherapy.

2.4.3 Remaining volume at risk (RVR) and OARs

The volume that is within the imaged region of the patient, but outside all delineated OARs and CTVs should be identified as the "remaining volume" at risk (RVR) (ICRU 83, 2010). Doses to the RVR should be reported in addition to the doses to specifically delineated volumes of interest (VOI) in order to ensure that attention is paid to all tissues, and not just a selected subset of them. There could be for example unsuspected regions of high dose within the patient that would go undetected if RVRs were not explicitly evaluated, particularly if IMRT is used. In addition, the dose to the RVR can be useful in estimating the risk of late effects such as carcinogenesis, which would have to be specified for various structures.

3 BIOLOGICALLY WEIGHTED ABSORBED DOSE: EQUIEFFECTIVE, ISOEFFECTIVE AND EQDX DOSE CONCEPTS AND FORMALISM

3.1 From (physical) absorbed dose to biologically transformed ("bioeffective") absorbed dose

Absorbed dose is a fundamental and rigorously defined quantity [BIPM, 2006; ICRU, 1998]. Regardless of the type of radiation and biological system, the radiobiological and clinical effects are always related to the absorbed dose. National and international (i.e., BIPM) standards laboratories guaranty the accuracy and reproducibility of reference absorbed dose measurements. Dosimetry protocols are regularly recommended and improved by medical physics associations or commissions (including ICRU) concerning the therapeutic irradiations.

In radiation-oncology applications, the clinical outcome is always closely related to the absorbed dose. Therefore the ICRU has recommended that the absorbed dose distribution and the associated temporal information be reported in an accurate and complete way in order to allow one to understand and interpret its effects and eventually reconstruct the irradiation conditions if needed (ICRU 1999, 2004; IAEA-ICRU 2007-2008; Wambersie et al., 2009).

As absorbed dose is a pure physical quantity, there is no need to imply any biological hypothesis or model. However, the same absorbed dose may give rise to very different biological or clinical effects depending on the irradiation conditions such as:

- average dose rate (and instantaneous dose rate),
- dose per fraction or dose per pulse (and interval between pulses),
- overall time (and other time-dose relations),
- radiation quality (LET),
- dose distribution (and inhomogeneities),
- clinical and technical irradiation conditions,
- others (e.g., heat, chemotherapy, etc)

Furthermore, the influence of these factors on the biological effects depends on the biological systems and effects (or endpoint) considered (e.g., early or late effects on different types of tumors and normal tissues).

Therefore specification of absorbed dose alone is in general not sufficient to predict the biological effects. For radiation therapy applications, when exchanging clinical information, when comparing or combining (adding) treatments performed under different technical conditions (i.e., when altering the treatment protocols or designing new protocols), weighting/transformation of the absorbed dose is necessary to predict and compare ultimate biological effects. These weighting/transformation functions have to take into account all factors that could influence the clinical outcome, depending on the treatment protocols that are compared. The numerical values of these transformation functions may vary significantly with the

biological systems or effects (endpoint) considered, e.g., early or late effects, cancer induction, physiological conditions of the irradiated system and technical irradiation conditions (e.g., degree of oxygenation, temperature). They may also be influenced by the individual radiosensitivity and pathological conditions of the patient, anaemia, previous and/or concomitant chemotherapy that are known to affect the clinical outcome.

In general, late-responding tissues are more sensitive than early responding tissues to a change in dose per fraction, dose rate or LET. The dose per fraction and degree of oxygenation are less important with high-LET radiation.

Lastly, comparison of radiation doses delivered using different therapy modalities implies that they are specified in the same way, i.e., at reference point(s) and/or at points on the DVH (see section 5 below).

For these reasons, when treatments delivered using different therapy modalities or protocols have to be compared, and to make this comparison easier and avoiding confusion, concepts like "equieffective" and "isoeffective" absorbed dose were introduced jointly by the IAEA and the ICRU for radiation therapy applications [IAEA-ICRU, 2008; ICRU-GEC-ESTRO, 1012].

For treatments delivered with high-LET radiations such as carbon-ion or fast neutron beams, radiation quality (and the resulting RBE differences) raises complex issues that are still a matter of clinical and radiobiological debate. Radiation quality and RBE concepts are discussed at length in section 4.

3.2 The equieffective absorbed dose concept

3.2.1 Definition

The "equieffective doses" (D_{EquiE}) are defined as the absorbed doses that, when delivered under different but specified conditions, produce the same probability of a given radiation radiobiological/clinical effect or endpoint

The "equieffective absorbed dose" concept has been developed exclusively for radiation-therapy applications for specifying, comparing or combining the doses prescribed (and delivered) when two (or more) different techniques are used.

Absorbed doses D and equieffective doses D_{EquiE} are both expressed in Gy. The use of the same unit to express two quantities may include a risk of confusion (see discussion later section 3.3 and 5.5).

The determination of equieffective doses includes the effects of all treatment parameters and conditions such as fraction size, dose rate, overall time, radiation quality, the use of chemotherapy or biological response modifiers and others. These factors are not independent from each other and their effects depend on the biological system and endpoint under study. Chemotherapy and biological response modifier may have an additive, synergistic or protective effect and may have a differential effect on tumor cells, acute responding tissues or late responding tissues.

In external ion-beam therapy, the total dose, dose distribution, fractionation, overall time and radiation quality are the main factors that have to be taken into account (Fig. 3.1).

3.2.2 Selection of the reference conditions for comparison

Any comparison between different irradiation treatment techniques implies the selection of reference conditions. The specified and reported numerical values of equieffective doses are thus meaningful only to the extent that the following conditions are fulfilled:

- 1) the irradiation conditions selected as reference for comparison are accurately and completely specified. This includes in particular: fractionation, dose rate, overall time, radiation quality.
- 2) the biological systems and effects or endpoints for which the equieffective doses are evaluated are specified. Different numerical equieffective dose values could be obtained for different endpoints (e.g., late or early effects, early or late responding tissues).

3) the method used for prescribing and reporting the dose is the same for the compared techniques and is specified, e.g., the dose at reference point(s) or a dose value specified on the DVH curve (e.g., D_{50} , D_{90} , D_{98} or others).

4) the tissue volume(s) (e.g., CTV, PTV, others) selected for evaluation of the equieffective doses should be the same for the compared techniques and should be specified.-

5) the biological models used should be specified and be valid for the evaluated irradiation schedules that is evaluated

The methods used to fulfil these conditions should be clearly and completely specified and reported allowing one to repeat the comparison of the equieffective doses using different biological and clinical hypotheses.

It is self-evident that the same reference treatment modalities and conditions must be accepted and agreed upon by all teams participating in a collaborative study.

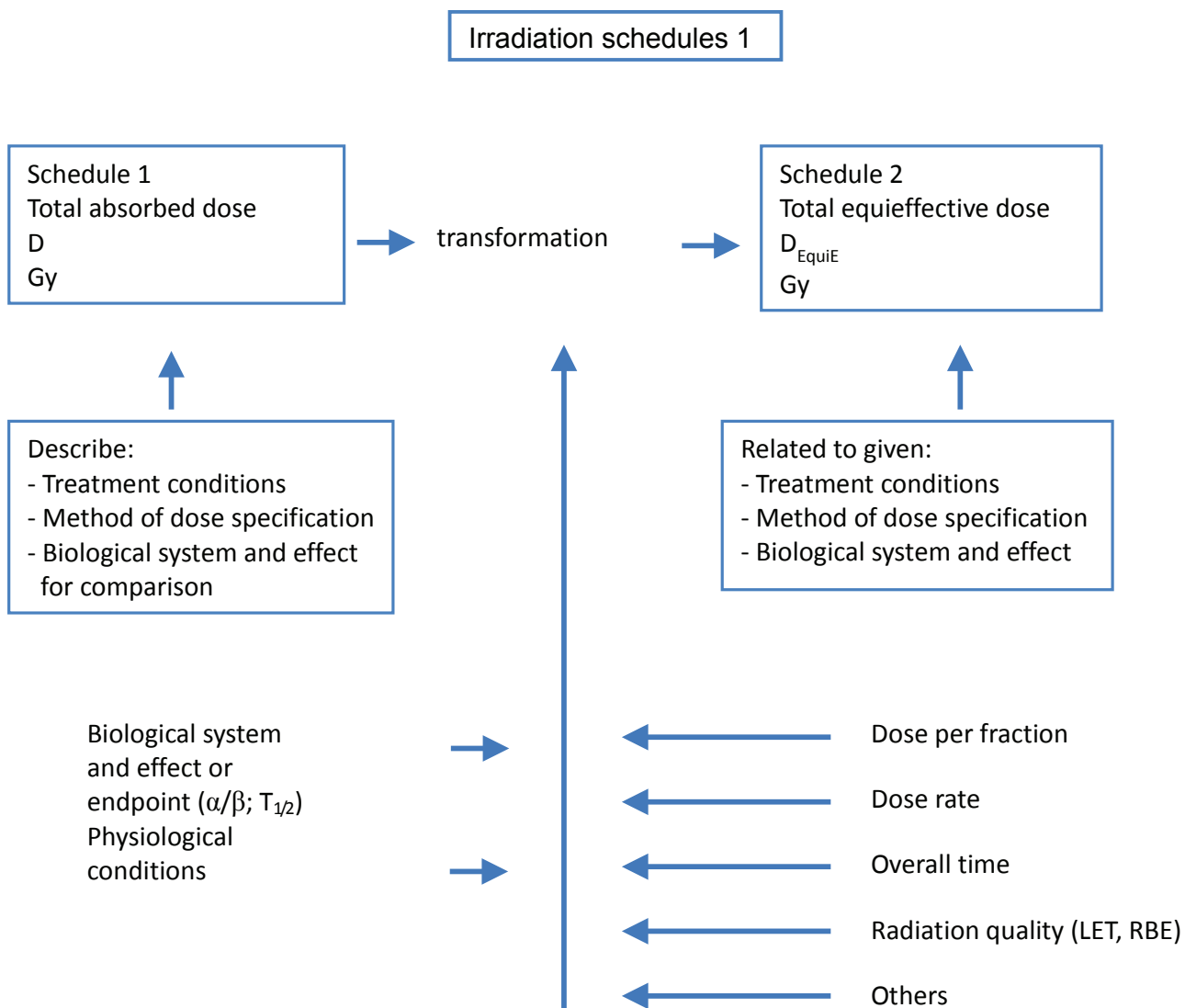


Figure 1: Transformation of absorbed dose, D, to equieffective dose, D_{EquiE} , applicable to all types of radiation therapy techniques. The concept of D_{EquiE} includes the combined effects of all parameters influencing the outcome. In addition, D_{EquiE} depends on the treatment conditions selected for the comparison. These have to be specified.

3.3 The isoeffective absorbed dose concept

The “isoeffective dose” is defined and can be used in much the same way as equieffective dose except that, when comparing two (or more) radiation treatments delivered under different conditions, the reference treatment technique for isoeffective dose is fixed: photons, delivered using 2 Gy per fraction, 5 fractions per week. The isoeffective dose is thus a particular case of the equieffective dose described above.

Isoeffective dose is expressed in gray just as absorbed dose. When a dose is reported, the corresponding quantity has to be clearly specified: absorbed dose, equieffective or isoeffective dose.

The majority of patients treated today curatively with external photon beams continue to receive fractions of 2 Gy, 5 times a week. On the other hand, in the past, considerable clinical experience has been accumulated with this schedule which has been widely accepted by the radiation-oncology community. The relationships between dose (numerical values) and clinical outcome using this schedule are well established. This broad clinical experience should not be neglected.

This is the reason why in external photon-beam therapy for the majority of patients, 2 Gy photon fractions, 5 fractions per week has been recommended (IAEA-ICRU, 2008) as a relevant universal reference for comparisons involving treatments delivered in different conditions. It is however recognised that the term "isoeffective" (even isoeffect) can be found in the literature with different meanings which has caused some confusion.

3.4 The EQD2 and EQDX α/β concepts

3.4.1 Definition

The EQD2 (equieffective dose in 2-Gy fraction)¹ concept implies that when comparing and/or combining two (or more) photon treatments delivered with different schedules, the selected reference treatment delivers 2 Gy per fraction. It also implies that the linear-quadratic model (α/β) can be used safely to calculate EQD2 (fractions not larger than ~ 6 Gy). The potential effect of variations in the overall time is not taken into account in the EQD2 concept.

EQD2 is currently in use (Joiner and van der Kogel, 2009) and recently recommended for external beam and brachytherapy photon treatments (ICRU-GEC-ESTRO, 2012). For mathematical modelling, it is always necessary to indicate for photons, apart from time-physical dose pattern also the values of the α/β ratios and $T_{1/2}$ parameters.

3.4.2 Possible extension of the EQD2 to the EQDX α/β formalism

The ICRU report on Bioeffect mathematical modelling (Bentzen et al., in preparation), proposes to extend the EQD2 to the EQDX concept which implies that any value of dose per fraction can be taken as the reference. However two choices dominate the published literature to date, $X = 2$ (two) and $X = 0$ (zero). $X = 2$ implies that the treatments are prescribed (and reported) using 2 Gy per fraction (see above 3.3). In photon-beam therapy, the radiation oncologists are familiar with the EQD2 numerical dose values. If $X = 0$, EQD0 is the same as the BED (Biologically Effective Dose) i.e., the equieffective dose delivered using absorbed doses per fraction approaching zero Gy- obviously an asymptomatic condition (Fowler, 1989).

$$EQDX_{\alpha/\beta} = D (d+\alpha/\beta)/(X+ \alpha/\beta)$$

¹Historically, the word "equivalence" was included in the terminology EQD2 but this is discouraged because of the possible confusion with the concept of "equivalent dose" recommended by the ICRP for protection purposes (ICRP, 2010).

D is the total (physical) absorbed dose, d is the actual fraction dose, X is the reference dose per fraction. For $X \rightarrow 0$, EQDX \rightarrow BED.

On the other hand, the EQDX _{α/β} formalism can be extended to any radiation quality by selection of the appropriate (endpoint-specific) α/β value. For high-LET radiation (carbon-ion beams), the effects of LET (RBE) has to be considered and the biological effects may be different in type and size after high and low-LET irradiation, late effects are more pronounced than early effects and the influence of dose per fraction is reduced after high-LET irradiation.

The potential effect of variations in the overall time is not taken into account in the EQDX _{α/β} concept.

Among the different factors involved, the influence of the radiation quality, LET and, as the result, the RBE raise issues that are specific and important in ion-beam therapy. These issues, which are still a matter of debate, are presented in detail in the next section 4.

3.5 Application of the equieffective and isoeffective absorbed dose concepts to the different radiation therapy techniques

3.5.1 Fractionated Photon-Beam Therapy

In external photon beam therapy, the radiation oncologist can adjust two main parameters: the dose per fraction and the overall treatment time

The radiobiological bases and models to evaluate the transformation factors are described in detail in the literature [Hall 1991], [Joiner 2009]

Dose per fraction

The influence of an alteration of the dose per fraction is evaluated using the α/β model:

$$D[1 + d/(\alpha/\beta)] = D'[1 + d'(\alpha/\beta)]$$

Where D and D' are the total doses, and d and d' the doses per fraction delivered using the reference and the actual fractionation schedule, respectively.

Values of 3 Gy and 10 Gy for α/β are recommended as an approximation for late and early effects, respectively. A value of 10 for α/β is often used for tumors [Joiner 2009].

Prostatic cancers that appear significantly more sensitive to changes in fractionation than most other cancers illustrate an exception. The estimated α/β value is 1.5 Gy [0.8, 2.2]. This result is not too surprising as there is a documented relationship between cellular proliferative status and sensitivity to changes in fractionation, and prostatic tumors contain exceptionally low proportions of proliferating cells. [Brenner, 1999]

As an example to illustrate this issue, for a head and neck cancer a total photon dose of 70 Gy is planned to be delivered with 2 Gy fractions 5 times a week (the overall time is thus 7 weeks). When 3 Gy per fraction are applied and using the linear-quadratic mode and the numerical values given above, the same late effects are produced with 58 Gy (-17%) and the same early effects are observed with 65 Gy (-7%). This example illustrates how smaller doses per fraction (2 instead of 3 Gy) selectively protects against late effects.

The next comparison illustrates the importance of the selection of the type of clinical/radiobiological effect. A "physical" absorbed dose of 58 Gy delivered with fractions of 3 Gy corresponds to an isoeffective dose of 70 Gy for late effects (reference 2 Gy per fraction specified in the same way and delivered in the same conditions). However a "physical" absorbed dose of 65 Gy delivered with fractions of 3 Gy corresponds to an isoeffective dose of 70 Gy for early effects (reference 2 Gy per fraction specified in the same way and delivered in the same conditions).

Overall treatment time

The influence of an alteration in overall treatment time is more difficult to evaluate. Generally an increase of total absorbed dose of 0.5 Gy per additional day seems reasonable [Joiner 2009].

3.5.2 Proton-Beam Therapy

While in external photon beam therapy the radiation oncologist has the possibility to adjust only two parameters (dose per fraction and overall time), in proton and carbon-ion therapy, the radiation quality (and resulting RBE) also has to be taken into account.

As indicated above, for protons a "generic RBE" of 1.1 was recommended for all clinical relevant applications [ICRU 2007]. When the protons are delivered under the same conditions as the photons taken as the reference, the proton isoeffective dose is simply $D_{\text{IsoE}} = D \times 1.1$. Additional weighting factors have to be applied in case of differences in dose per fraction and/or overall time.

3.5.3 Carbon-Ion (12C) Beam Therapy

For heavier ions used in radiation therapy (e.g., ^{12}C) the issue is more complex than with protons because the LET (and thus the RBE) varies markedly with particle type, energy, method of beam production, depth in tissues, etc. It is important to stress that the influence of the different factors (LET, dose per fraction, type of effect) are not independent from each other (reviewed in [Wambersie 2010]).

Two different approaches are being used to evaluate the RBE and the isoeffective dose for prescribing, planning and reporting carbon-ion therapy. In Chiba, Japan, where passive scattering is used, an RBE of 3 is assumed at a point located at 2/3 of the depth in the SOBP. This RBE value of 3 was the "clinical RBE" adopted for fast neutron therapy in the previous Chiba experience and considered to be satisfactory. The mean LET for fast neutrons (~80 keV/μm) is similar to the LET of ^{12}C at the selected point at 2/3 in the SOBP. On the other hand, the RBE variation in the SOBP is based on a series of experiments performed at the Chiba facility (see figure 2 below).

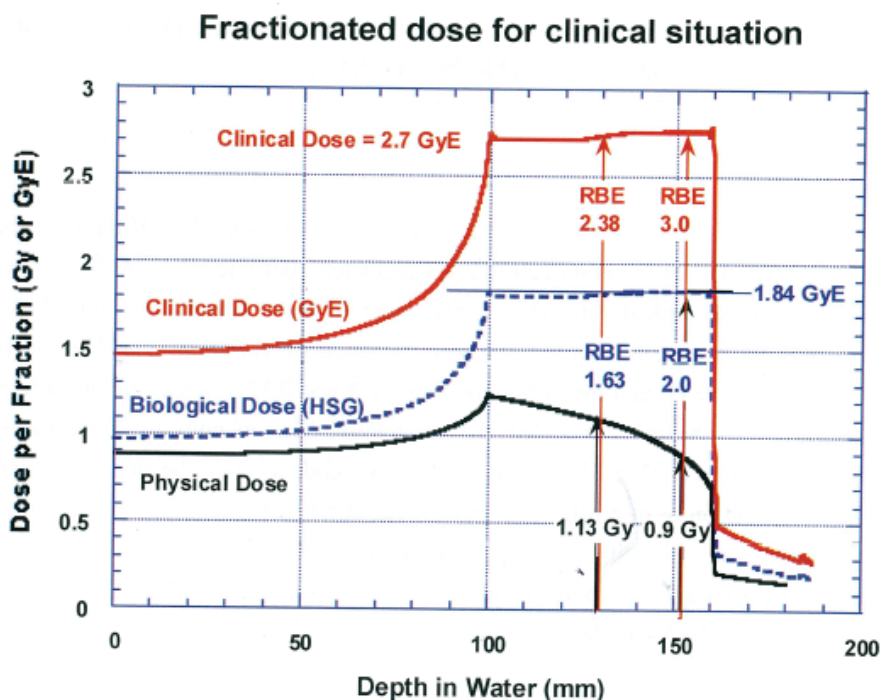


Figure 2: Depth-dose curves in the 290 MeV/u carbon-ion beam with a 6 cm SOPB at NIRS Chiba-Japan. The doses per fraction are compared. In black: the (physical) absorbed dose. In blue: the "radiobiological" dose derived from radiobiological experiments). In red: the "clinical" dose (derived from clinical neutron experience, see text) [T. Kanai, et al., proceedings of NIRS-MedAustron symposium, 2006; p84].

In Darmstadt-Heidelberg, Germany, where a scanning beam technique is used, the equi/isoeffective dose is computed point by point (voxel) in the target volume based on local LET, absorbed dose, dose per fraction, selected biological system and effect [Kraft 2007].

In addition to the isoeffective dose as defined above in this document, when comparing (combining, adding, ...) different treatment modalities, dose ratios or "equivalences" could be evaluated besides the ratio of the PTV doses. For example one can evaluate the "equivalence" as the dose ratios to the PTV specified in a different way (D98 instead of D50 or D98 instead of the dose at the ICRU Ref point) or weighted doses to normal tissues at risk (spinal cord, eye, heart, rectum, etc.). The methods used to perform this weighting and to evaluate the "equivalences" should of course be specified, allowing one to repeat the evaluation of the "equivalence" based on different hypotheses. Harmonisation (and agreement at the international level) on the methods used to evaluate the "equivalence" between different treatment modalities is one of the goals of the ICRU.

4 RADIATION QUALITY, MICRODOSIMETRY AND RELATIVE BIOLOGICAL EFFECTIVENESS (RBE)

4.1 The RBE concept

Radiation quality is defined by the type and energy spectrum of the ionizing particles at the point of interest. It is well established that, at equal absorbed dose, different radiation qualities may produce different biological effects.

The concept of Relative Biological Effectiveness, RBE, has been introduced jointly by the ICRP and the ICRU [ICRP 1963] and defined again by the ICRU (Report 30,1979).

When two (or more) different radiation qualities have to be compared one of them has to be selected as the reference, the other (ones) are the test radiation(s) under study.

Radiation quality: type, energy and direction spectra of the ionizing particles at the point of interest. It can be approached by computation (using the radiation Linear Energy Transfer, LET) or measurement (microdosimetry).

The concept of LET was introduced when the first radiobiological research showed how the biological effects of the irradiation were not dependent exclusively on the total absorbed dose but also on the density of the energy released by the particles in their path. LET most recent definition is given in ICRU report 69 (1998).

Microdosimetry data are represented in terms of the spectra of the lineal energy, y , which is the energy, imparted by single events to a volume divided by its mean chord length. According to ICRU 40 [ICRU 1986] microdosimetry spectra are indications for radiation quality purposes, providing that the volume simulated is a sphere of 1 μm of diameter of ICRU muscle tissue equivalent.

The two concepts of LET and lineal energy are different because the first represents *non-stochastic* quantity and it takes into account the energy *transferred* by the ionizing radiation, while the second has a stochastic value and considers instead the energy *absorbed* in the sensitive volume.

Beam quality: defines the characteristics of the beam by specifying parameters such as depth dose, homogeneity, penumbra, etc.

For radiotherapy proton beams IAEA indicates the measure of beam quality as the beam residual range in water, R_{res} , [IAEA TRS 398 Code of Practice] under specified conditions. The residual range at specific depth z is the distance between z and the depth at which the dose distal falloff reaches the 10% of the Bragg peak amplitude.

In case of therapy beams of ions heavier than protons the use of the residual range is not sufficient to describe the beam quality. Because of the insufficient number of experimental and theoretical data, IAEA

code of practice suggests to specify all beam characteristics indicating atomic number, mass number, energy of the incident beam, width of SOBP, and range.

4.2 Definition of RBE

The RBE of a test radiation quality compared to the reference radiation quality is the ratio of the doses delivered with the reference radiation and the test radiation, respectively, that are necessary to produce a given biological effect on a given system, all other conditions being the same:

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

A reported RBE value is meaningful only to the extent that the reference radiation quality, the biological system, effect, absorbed dose level and irradiation conditions are specified.

The validity of a given RBE value is limited to the conditions under which it has been determined.

For example, a RBE reported value (such as RBE = 3 for ¹²C relative to ⁶⁰Co) is thus meaningful only to the extent that the biological system, effect and irradiation conditions are specified.

4.3 Reference radiation quality

A RBE value can be determined for any couple of two radiation qualities, one of them being taken as the reference. However in order to facilitate exchange of information and reduce the risk of confusion, selection of a (general) reference radiation quality would in principle provide obvious advantages.

Initially, 180-220 kV X-rays were selected as the reference radiation quality to define the RBE(s), because of their wide availability [ICRP-ICRU, 1963]. Later on higher photon energies (⁶⁰Co, photons of ~2-35 MV produced by linacs) progressively became the reference [ICRU 1993]. No significant RBE variation could be detected in this high-energy photon range; it was not the case initially with the 200 kV X-rays).

4.4 Review of available microdosimetric data

The RBE variations can be interpreted using the microdosimetric spectra of the different beam qualities.

Fast neutrons

Compared to cobalt-60, the fast neutron y spectra (Fig. 3) are significantly shifted towards the high y values which allow one to interpret the high "clinical" RBE values (~3-5). Fast neutrons are "high-LET" beams.

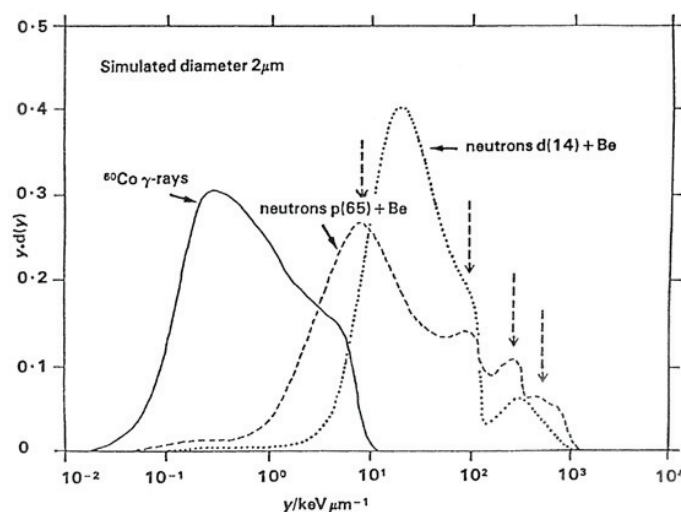


Figure 3: Comparison of the microdosimetric spectra $y.d(y)$ vs. y obtained for ⁶⁰Co γ -rays, d(14)+Be neutrons and p(65)+Be neutrons. ULICE -GA n°228436 Page 23 of 49

p(65)+Be neutrons, i.e., the lowest and highest neutron energies applied for therapy, respectively. y is the lineal energy and $d(y)$ is the probability density of absorbed dose in y . For ^{60}Co γ rays, the maximum $y \cdot d(y)$ value occurs at about $0.3 \text{ keV } \mu\text{m}^{-1}$ and for d(14)+Be neutrons it occurs at about $20 \text{ keV } \mu\text{m}^{-1}$. Four peaks are observed in the p(65)+Be neutron spectrum (vertical arrows): at about $8 \text{ keV } \mu\text{m}^{-1}$, $100 \text{ keV } \mu\text{m}^{-1}$, $300 \text{ keV } \mu\text{m}^{-1}$ and $700 \text{ keV } \mu\text{m}^{-1}$, corresponding to high-energy protons, low-energy protons, 4He particles and heavy recoil nuclei, respectively [Gueulette, 1998].

(Clinical) proton beams

For proton beams in the plateau region, the y spectra are moderately shifted towards the high y values, which can explain the 1.1 "generic" RBE value (Fig. 4, curve A). In addition the further shifts at two different depths within the SOBP and at the distal falloff (curves B, C, and D respectively) explains the further RBE increase.

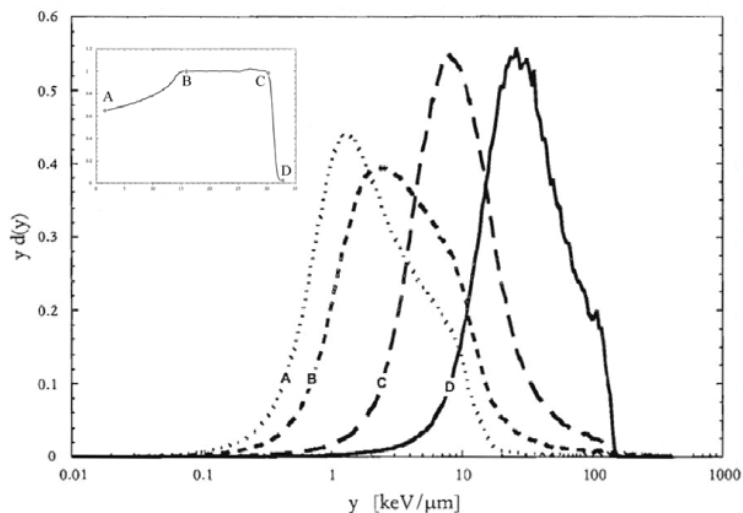


Figure 4: Microdosimetric spectra collected at different depths for a clinical SOBP obtain from the 65 MeV proton beam Nice. Spectra are marked with letters A, B, C, and D (with max depth of 33 mm) corresponding to the four positions marked in the small insert, plateau, proximal and distal SOBP, and falloff [De Nardo 2004].

Photons

There is no variation in the microdosimetric spectra and no observed significant RBE variation between photons and electrons with energies above $\sim 1\text{MeV}$ (today usually taken as the "reference" radiation quality) (Fig 5 and 6). 180 kV X-rays show z spectra slightly shifted towards the high values that explain the slightly higher RBE values relative to ^{60}Co . Like proton beams the 180-200 kV X-rays are "low-LET" radiations.

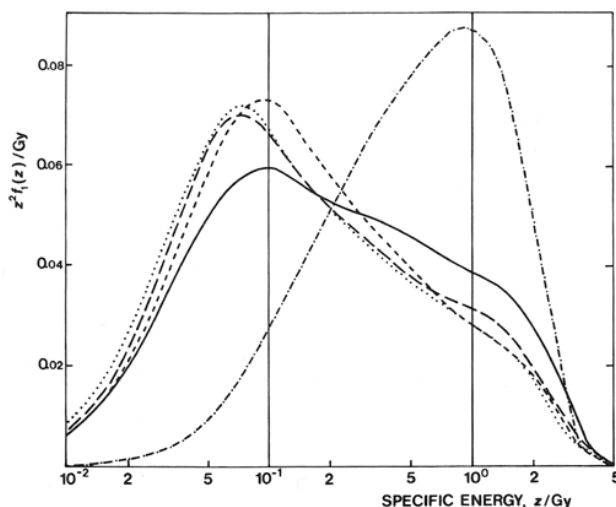


Figure 5: Microdosimetric spectra for photons and electrons beams. Single-event specific-energy (z) distributions measured in 5 different beams, at the maximum of the depth-dose curves: — cobalt-60 gamma rays; - · - · - 180 kV X-rays with HVL=0.9 mm Cu; - - - - 39 MeV electrons; ······ 8 MeV electrons; - - - - 42 MV X-rays.

The distributions are normalized per logarithmic interval and thus equal areas under the curve will contribute equally to the specific energy. (from Lindborg, 1976, cited in ICRU Report 35, 1984).

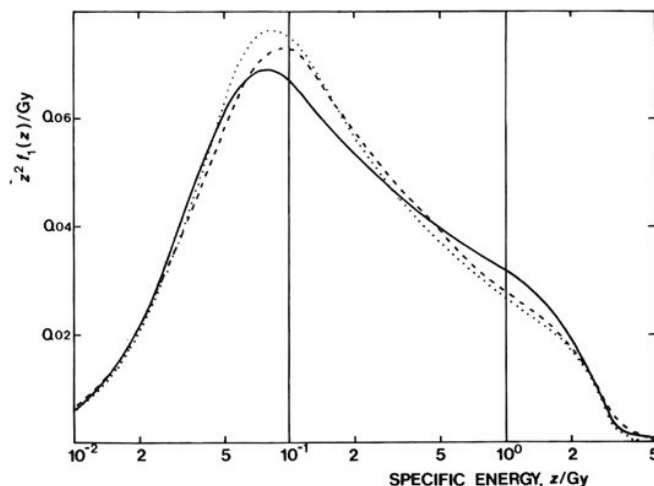


Figure 6: Single-event specific-energy (z) distributions measured in an electron beam at different depths in the irradiated phantom: ······ 0.5 g cm⁻² i.e., 97 % depth dose level; - - - - 2.4 g cm⁻² i.e., 100 % depth dose level; — 5.7 g cm⁻² i.e., 66 % depth dose level

The most probable electron energy at the phantom surface is 15 MeV. The normalizations are the same as in Fig 4. (from Lindborg, 1976, cited in ICRU Report 35, 1984).

Carbon-ion beams

Some microdosimetric y spectra measured at NIRS are shown below.

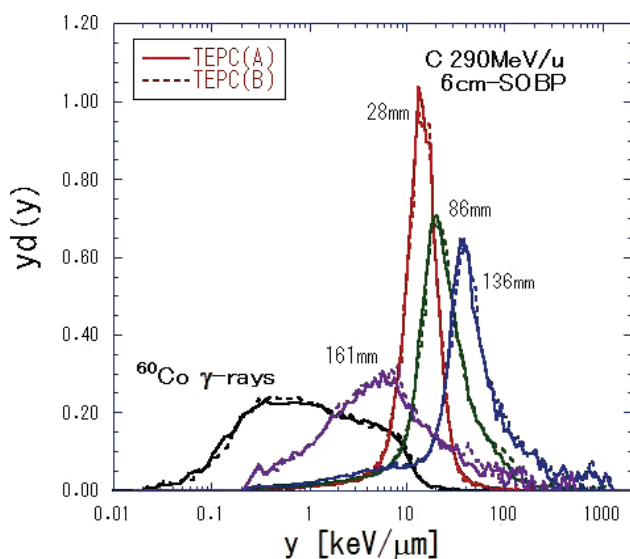


Figure 7: Microdosimetric data for C-ion beams measured at NIRS [Kase 2011]

The comparison between measured and computed data is displayed in figure 8.

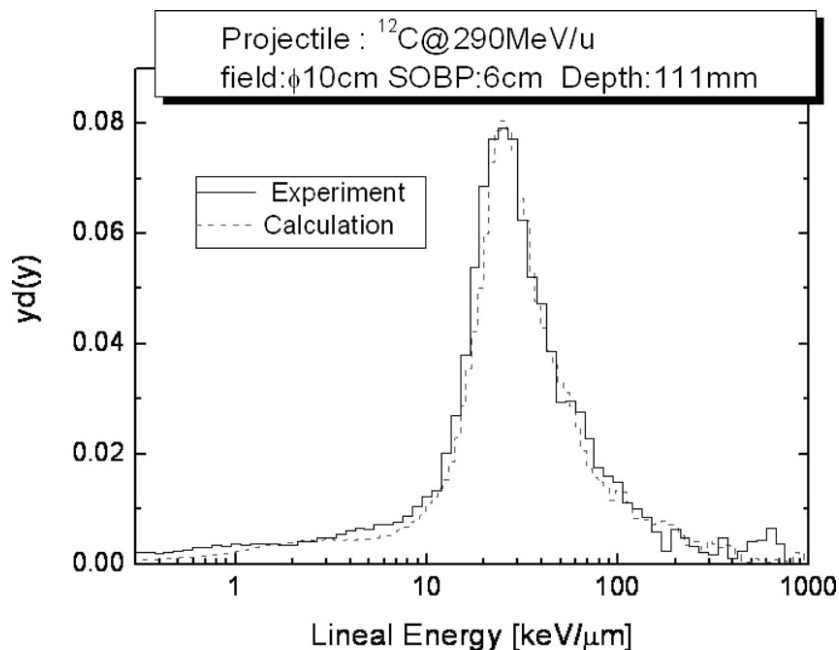


Figure 8: $Yd(y)$ spectrum vs. lineal energy per event. Field size is $100 \times 100 \text{ mm}^2$ and depth in the water phantom is 111 mm, the middle of the SOBP. The solid line shows the result of the experiment and the dashed line shows that of calculation. [Nose 2009]

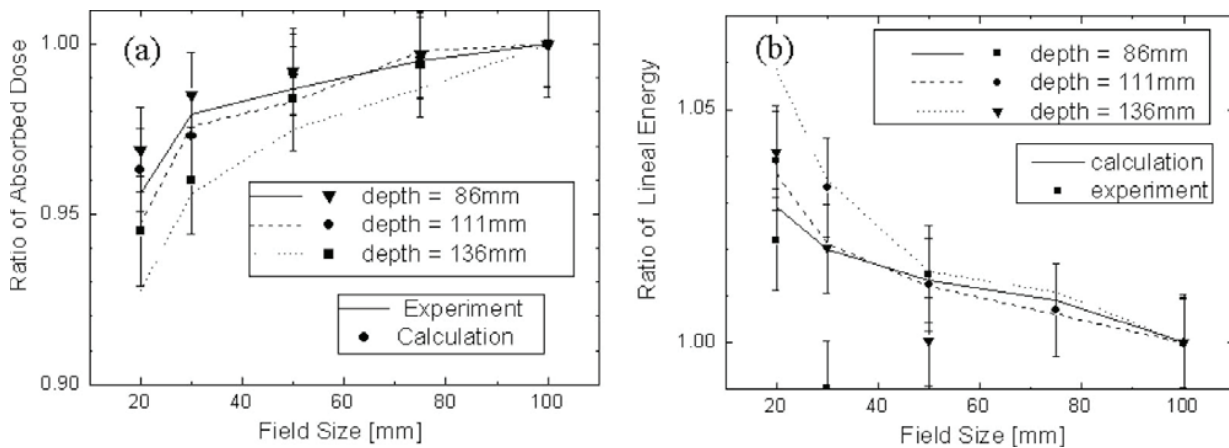


Figure 9: Field size dependency of absorbed dose (a), and dose-averaged lineal energy (b) in the SOBP region. Profiles at the entrance (86 mm), middle (111 mm), and fall off (136 mm) of SOBP are shown. Both vertical axes are normalized by the values where the field size is 100 mm. [Nose 2009]

Figure 10 shows the spectra of the lineal energy, y , as a function of distance (x) from beam axis

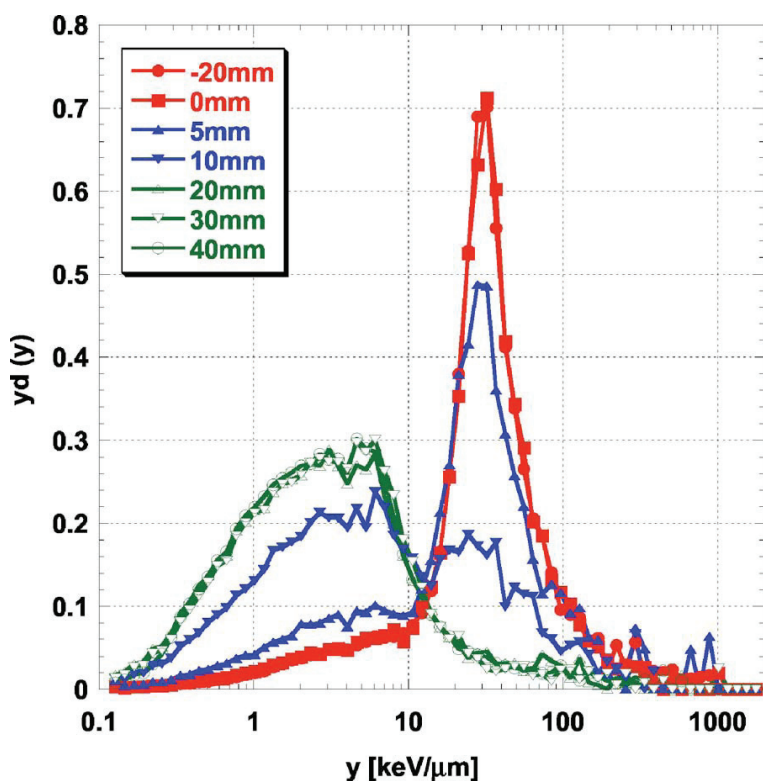


Figure 10: y -spectra of the angular distributions of the fragmented nuclei of a 350 MeV/u therapeutic carbon beam blocked on half of the irradiation field and measured in a water phantom of 135 mm in thickness placed just upstream of the detector. Measurements are made along the x -axis orthogonal to the depth axis of the beam. Positions $x=20$ (inside of the beam), 0 (on the axis at the edge of the block), 5 (and for the following, outside of the beam in the shade of the block), 10, 20, 30, and 40 mm. [Kusano 2007].

5 REPORTING DOSE AT SELECTED (REFERENCE) POINT(S) AND /OR DOSE-VOLUME HISTOGRAMS

5.1 Introduction

For a useful exchange of medical and technical information, it is important that the approach adopted to report doses and dose distributions would be harmonised. Our irradiation techniques are not so perfect that the dose distributions in the target volume(s) would be homogeneous (this applies even for the identified subvolumes). Therefore some dose value(s) at reference points or alternatively some dose levels taken on dose-volume histograms (DVH) have to be selected for prescribing and reporting. The ICRU has been involved since decades in recommendations for reporting radiation therapy (starting with ICRU Report 29 in 1978).

Selection of relevant reference points for reporting dose was recommended in the first ICRU reports (ICRU, 1978, 1993, 1999, 2004). The ICRU has recently recommended to specify, in addition or as an alternative, the doses to volumes expressed as dose values taken on the corresponding DVH. In particular D50, D98 and D02 on the DVH curves have been recommended [ICRU 2007, 2011 and 2012].

5.2 Selection of reference points for prescribing and reporting

The reference point (*ICRU Reference Point*) should be selected according to the following general criteria:

- (a) the dose at the point should be clinically relevant and representative of the dose distribution in the PTV;

- (b) the point should be easy to define in a clear and unambiguous way;
- (c) the point should be in a region where there is no steep dose gradient;
- (d) the point should be selected where the dose can be accurately determined (physical accuracy).

These recommendations will be in general fulfilled if the reference point is located:

- first at the centre (or in the central part) of the PTV ,
- secondly when possible at the intersection of the beam axes.

There are of course situation where these conditions cannot be fulfilled (they are discussed in detail in ICRU Reports 50 [ICRU1993] and 62 [ICRU 1999]) and other more relevant points/criteria need to be selected for individual patients. For example the presence of shielding blocks or other dose heterogeneities could influence the selection of the reference point for reporting.

At the time when this approach was proposed the radiation oncologists selected in general the irradiation conditions with the goal of achieving a homogeneous dose distribution within the PTV (+7% and -5%). Because a certain degree of inhomogeneity of the absorbed dose throughout the PTV cannot be avoided, it was recommended to report in addition to the dose at the ICRU Reference Point, the best possible estimation of the maximum and the minimum dose to the PTV [ICRU 1999 and ICRU 2004].

As shown as an example in the figure 11, these recommendations were suitable and found to be useful especially for comparing the clinical data for many years. They have shown their clinical relevance

When these recommendations were first published (2D reporting), it was not possible for technical reasons to report dose-volumes histograms, DVH (on a routine clinical basis). However when computation of DVH (3D reporting) became progressively available, the ICRU always recommended to report the available DVH for the volumes of interest together with doses at reference points.

In addition to reporting doses at the PTV, reference points for reporting dose to some OAR are used since many years e.g., rectum and bladder ICRU reference points in cervix brachytherapy.

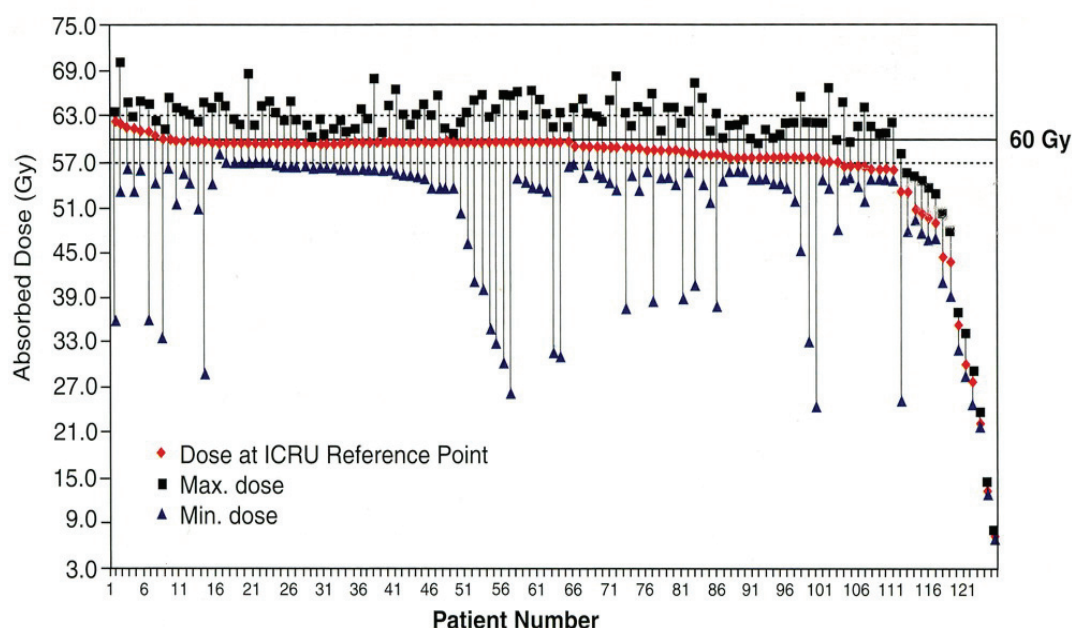


Figure 11: Multicentre (7 centres), randomised trial for a non-small-cell lung cancer, stage III, performed in Sweden. The prescribed dose (ordinate) was 60 Gy (+/- 5 percent) at the ICRU (central) reference point. A total of 125 patients (displayed in the abscissa) were included in the study: 82 % of them comply with the prescription (in red). There was a less satisfactory situation with the maximum dose (in black). The minimum dose (in blue) was within the accepted deviation in only 24 percent of the cases [cited in ICRU Report 71, 2004; p54].

5.3 Dose-volume histograms (DVH) and selection of dose values on the DVH curve for prescribing and reporting

The ICRU has recently recommended specifying the dose to the PTV based on the DVH curve. In particular reporting D50 and D98 dose levels (see definition later in this section) on that curve has been recommended [ICRU 2007, ICRU 2011 and ICRU 2012].

There are radiotherapy types of applications where selecting reference points is no longer possible and where the use of dose-volume histograms (DVH) is needed.

As a typical example, in brachytherapy, there is no plateau region where the dose is homogeneous and where it is possible to select a reference point that meets the criteria mentioned above (see fig. 13, left hand side). The same is true in some scanning beam applications in proton-beam therapy and carbon-ion therapy (see fig. 13, right hand side).

Several arguments support this change in orientation and the use of DVH:

- 1- the dose distributions in volumes are more clinically relevant than doses to points;
- 2- in some clinical situations the radiation oncologist does not want a homogeneous dose in the PTV. For example, sub-GTV(s) are identified within the GTV such as hypoxic zones, high proliferation zones, etc. This could imply a dose modulation of the prescribed dose to the PTV and the doses prescribed to the different sub-PTVs may be different;
- 3- the development of modern treatment planning and delivery techniques, today allow dealing routinely with doses in 3D (even 4D) volumes. This was not possible before.

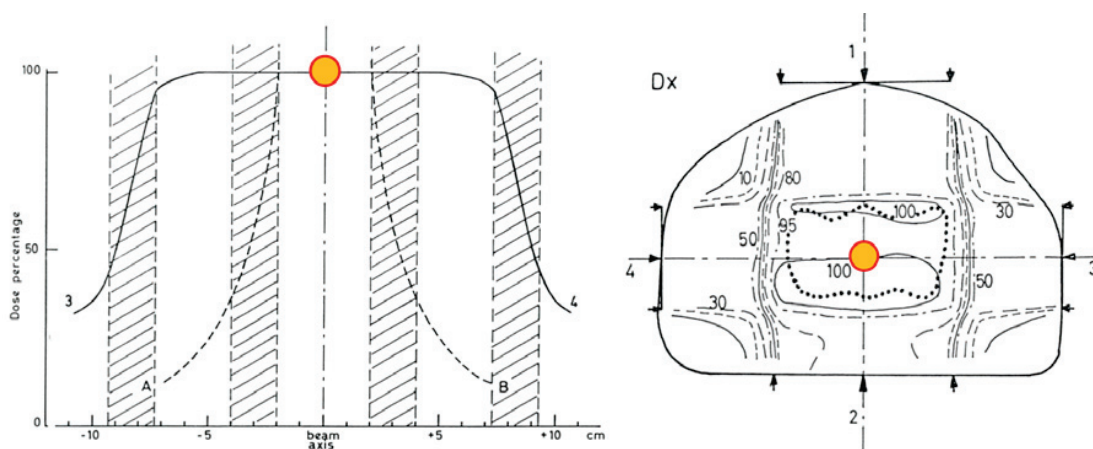


Figure 12: *On the right-hand side:* “box technique”, dose distribution in the central plane. The dose is rather homogeneous in the central part (even in most) of the PTV. The dose to the point of the beam intersection is representative of the dose to the PTV and is therefore clinically relevant for prescribing and reporting.

On the left hand side: dose profile (solid line for box technique) along the transversal central axis illustrating the dose homogeneity in the PTV. In contrast the dotted line represents the steep dose gradient for an intracavitary application [ICRU 1993]. In this steep dose gradient there is no obvious choice for selection a reference point for reporting.

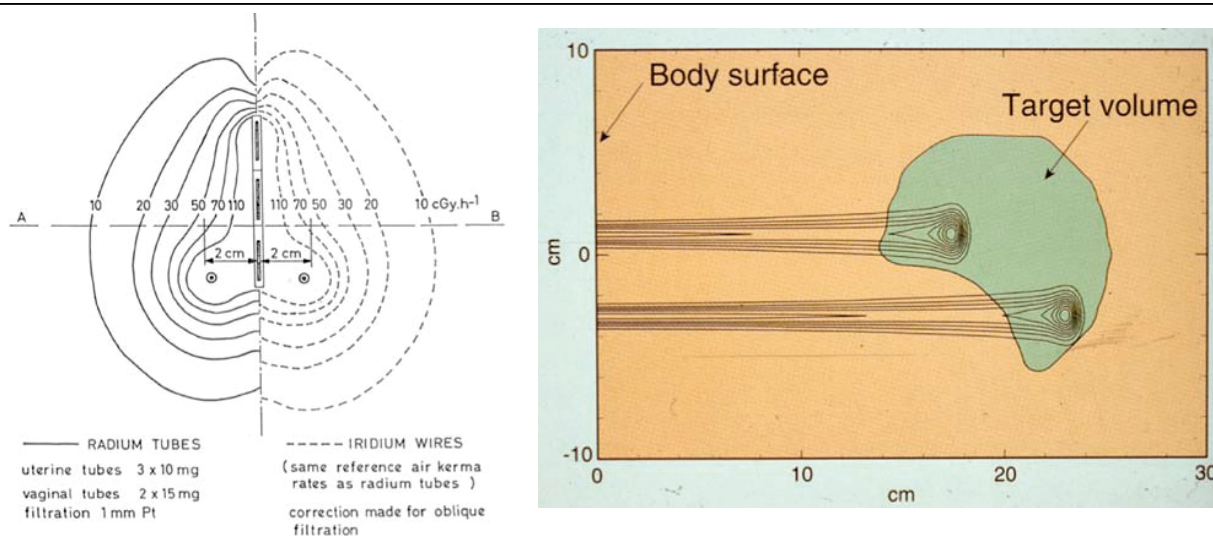


Figure 13: On the left hand side, dose distribution for an intracavitary application for a cervix cancer. There is a steep dose gradient as a function of the distance to the sources (a “physical” law). On the right hand side, for a scanning beam with ions the dose to the target volume is not (always) homogeneous. In the two cases illustrated here it is not possible to select a reference point for reporting according to the criteria indicated in section 5.2.

The Dose-Volume-Histogram (DVH) represents the volume that receives at least a certain dose plotted against absorbed dose. In practice, the DVH is currently displayed as cumulative. In ordinate, the volume is expressed in cm³ (absolute term) and or in percentage of the volume of interest (relative term). In abscissa, the absorbed dose is expressed in absolute values (Gy) or as a percentage (e.g. of the prescribed dose) (Fig 14). Although in principle, any dose value on the DVH curve can be reported, in order to facilitate exchange of information, the recent ICRU reports (ICRU 2007, 2011) recommend the following values:

- the median dose D50: 50% of the volume received at least this dose
- the near minimum dose D98: 98 % of the volume of interest (e.g. GTV, CTV, PTV or any OAR) received at least this dose.
- the near maximum dose D02 : the highest dose received by 2 % of the volume of interest.

For the PTV, these three dose values (D98, D50, D02) selected on the DVH curve are very close to the set of three values recommended in the first ICRU Reports i.e., the dose at ICRU Reference point, the minimum and maximum dose (see above 5.2). The dose D50 is in general close to the dose to the traditional ICRU reference point. Actually they both rely on the same clinical approach: selection of a dose value that is representative of the dose to the CTV/PTV. D98 is close to the minimum dose (i.e., actually D100). As far as the maximum doses are concerned, the near maximum dose D02 is expressed as a percentage of the volume of interest. The maximum dose as defined in the ICRU report takes into account the actual dimensions of the volumes of interest (Ø = 15 or 5 mm) depending on the location and the types of OARs.

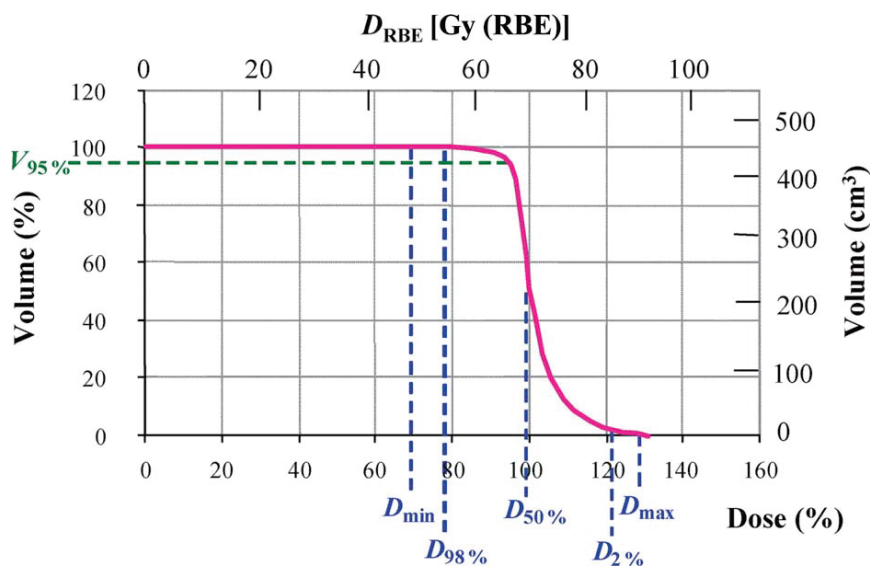


Figure 14: A typical dose–volume histogram display, illustrating the use of dual axes (relative and absolute values) for both the dose and volume dimensions (unfortunately, most commercial treatment planning systems do not support this feature), and how a number of volume and dose statistics can be read off from a DVH. $D_{50\%}$ is identical to D_{mean} , and D_{min} and D_{max} are identical to $D_{100\%}$ and $D_{0\%}$, respectively.

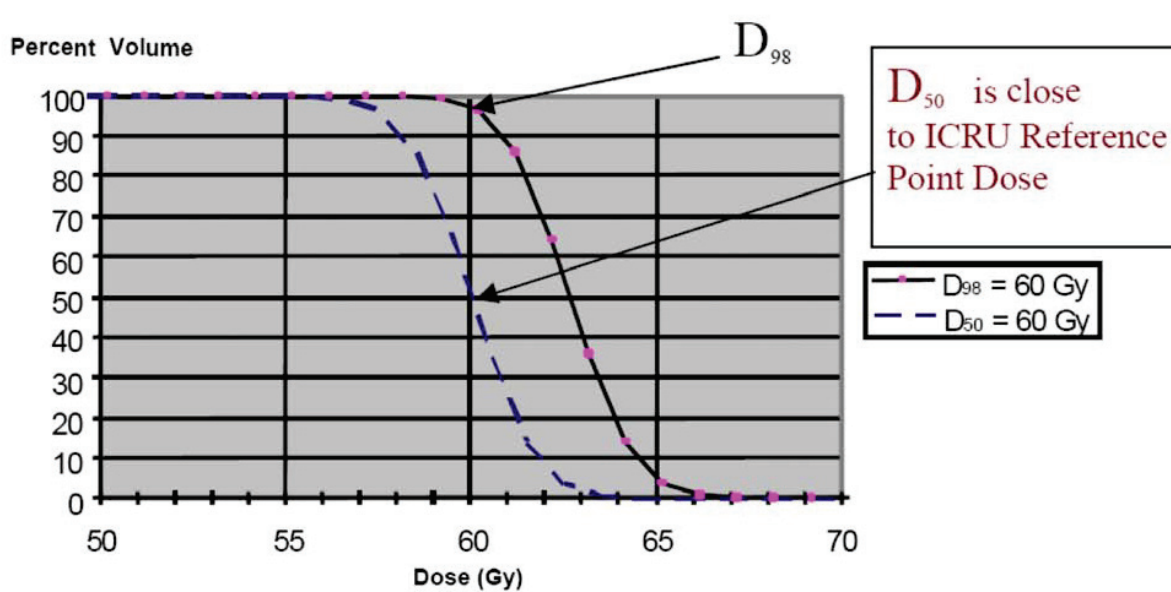


Figure 15: This figure illustrates that the same dose prescribed to D50 or D98 may result in significantly different doses to the patient (adapted from [ICRU 2007]). On the other hand prescribing the dose to the (traditional) ICRU reference point or to D50 may correspond to a similar clinical approach (see text) but may result in an actually systematic difference in dose that should be taken into account when comparing different (historical) patient series.

The risk of confusion when modifying the method of reporting. A dose of 60 Gy is prescribed and reported. Imagine that in the past the minimum dose was reported. 60 Gy was then at the level of D100 (or D98) and the DVH curve is the solid line. Following the recommendations in the IMRT report (2010), one selects to report the median dose to the PTV (D50). 60 Gy is now at the level of D50 and the DVH curve is the dotted line. As a consequence there is a significant difference of the PTV dose (~5 %) for the same reported dose of 60 Gy.

As an example, figure 16 shows the dose distributions obtained for a proton treatment of a chordoma of the skull base. It illustrates the amount of information that can be displayed based on the DVHs and corresponding to the target volumes and also mainly the surrounding critical normal structures (figure 17). This impressive amount of clinically useful information is much larger than by specifying the dose to some (reference) points.

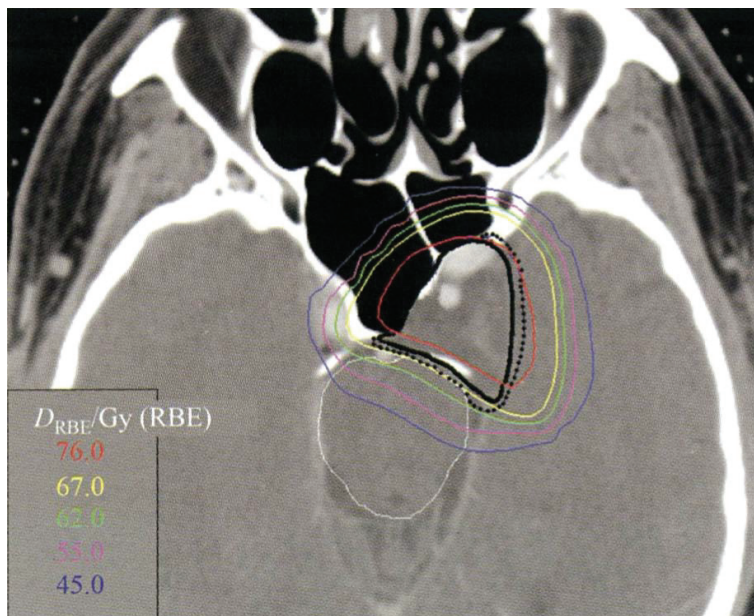


Figure 16: Isodose contours for the treatment of a chordoma of the base of skull using proton beams in the axial plane. The GTV and CTV are represented by solid black and dotted black lines, respectively [ICRU 2007].

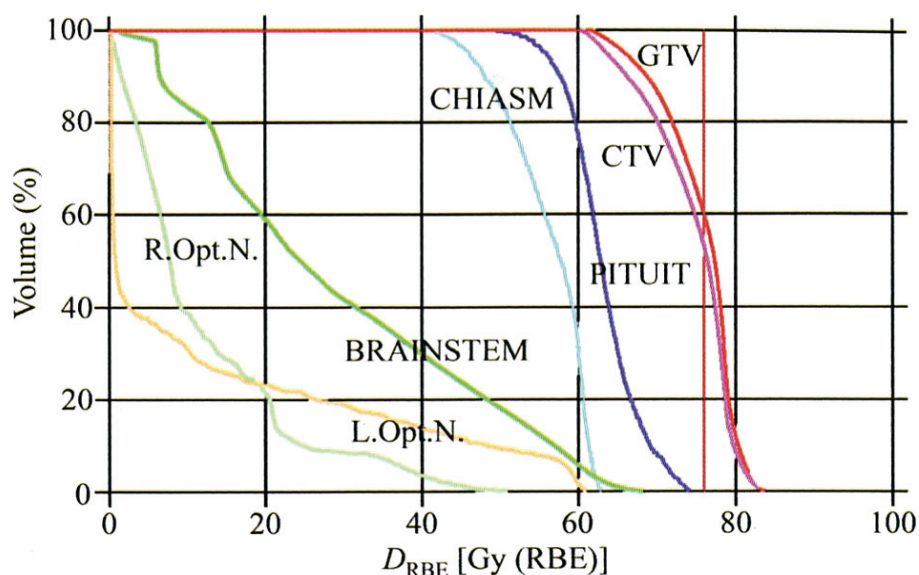


Figure 17: DVHs of GTV, CTV and five normal structures for the same patient described in Fig. 16 [ICRU report 78; 2007, p187].

This example illustrates that computing several relevant DVHs is probably clinically more relevant than reporting the dose at a point (even a few points). However, different technical modalities are more and more frequently combined: - cervix: external beam, brachytherapy and chemotherapy; - proton and ion beams are often used as a "boost" after photon beam therapy. One cannot combine (add) the doses if they are not related to common anatomical reference points or coordinate systems.

5.4 Recommendations for reporting doses and dose distributions in ion-beam therapy

Treatment conditions

In order to be able to understand and interpret the dose prescription and delivery, a complete description of the technique, time-dose pattern and other treatment conditions should be provided. In particular the PTV should be reported in a way one could reproduce exactly the treatment.

Quantities

Concerning the quantities, the (physical) absorbed doses should always be reported at the points and/or volumes of interest. The dosimetric techniques and protocols should be reported.

In addition (not instead of), the relevant "biologically transformed quantity" need to be reported. The equieffective dose (D_{EquiE}) and isoeffective dose (D_{IsoE}) concepts are discussed in section 3. When D_{EquiE} or D_{IsoE} are reported all factors or models that are used have to be specified (such as biological system and effect (i.e. endpoint, models and numerical values of the parameters used when applying the models, irradiation conditions, etc.).

If the approach and methods used to perform the dose transformation(s) and to evaluate D_{EquiE} or D_{IsoE} are fully specified, it is possible to repeat/compute the evaluation of these "bioeffective" quantities using different hypotheses or models (see section 3). Harmonisation (and agreement at the international level) on these approach and methods is one of the goals of the ICRU efforts (a report on "harmonisation" is in preparation).

Reporting DVH and dose at reference point(s)

Today due to the dramatic technological development reporting the DVH can be performed routinely and is recommended in ion-beam therapy. The DVH should be reported for both quantities i.e., absorbed dose and equieffective dose. It should be reported for all the volumes considered relevant for the study (related to the tumour PTV, CTV, GTV and several selected OARs). An example is given above for protons in Fig 17.

As stressed before, when a DVH corresponds to a "biologically transformed quantity" (D_{EquiE} or D_{IsoE}), all models and hypotheses that are used have to be specified (such as biological system and endpoint, models and numerical values used when applying the models, irradiation conditions, etc.).

On the tumour related DVH, D50, D98 and D02 values have to be reported in order to facilitate exchange of information between centres. In addition any other dose level can be reported if useful. The modal dose, D50, provides a relevant representation of the dose distribution in the volume of interest and is recommended.

When different techniques are combined in the global treatment strategy (e.g., IMRT and ion beams as in Heidelberg for salivary glands), different PTV may be defined. Adding the corresponding doses may be difficult and selection of the traditional ICRU reference point specified relative to well defined anatomical reference has obvious advantages. The concept underlying the selection of this reference point and its limitation in some particular cases has been discussed at length in previous ICRU reports [ICRU Report 62, 1999; Report 71, 2004].

When passive scattering (and few ion beams) are used, it is straightforward to specify the absorbed dose and equieffective dose to the PTV at the level of a point on the beam axes at the centre of the SOBP (selected as the ICRU Reference Point). Computing and displaying the dose distributions in the appropriate planes allows one to select the most relevant reference points for reporting and comparing the outcomes, avoiding some pitfalls related to dose inhomogeneities. Reporting only the DVHs is missing an anatomical/geographical reference, which is important when different treatment modalities are combined or compared. Like for DVH, (physical) absorbed doses and equieffective doses have to be reported at the selected reference point(s).

Actually, reporting together (physical) absorbed dose at reference point(s) and DVH is justified because two application techniques of ion-beam therapy (i.e., passive beam scattering and scanning beams) are used today and constitute both the basis of our clinical experience.

Dose limits to the OAR

The dose prescribed (and delivered) to the PTV takes into account a series of constraints related to the dose distributions in the OARs (or PRVs). They can be expressed in terms of the maximum dose tolerated to any part of the organ or the proportion of the organ receiving more than a given tolerable dose. The dose prescription is mainly based on the DVH for these OARs (depending in particular to the type of tissue "serial" or "parallel" like). The involved specific endpoints should always be reported.

Volumes

When reporting doses it is essential to specify the volumes where the doses are delivered. All clinically relevant volumes should be reported (such as PTV, CTV, GTV and OAR(s)). In case ion beam is part of a combined cancer-therapy strategy (e.g., as a boost), the volumes reported for ion-beam therapy should correspond to the time when ion-beam therapy is started.

Doses cannot be compared/combined/added if they are not related to common geographical reference points or coordinate systems. Similarly absorbed doses delivered with different techniques cannot be compared. In contrast equieffective doses are additive provided that they have been evaluated using the same methodology and radiobiological concepts and hypotheses (that should be clearly specified, see section 2).

5.5 Quantities, units and symbols

When reporting proton and ¹²C ion treatments, several quantities (physical) absorbed dose, and equieffective dose and isoeffective dose are expressed using the same unit the gray (Gy). Therefore the involved quantity has to be clearly reported each time it is necessary to avoid confusion.

For proton beam therapy, it is recommended that each time "Gy" relates to an equi/isoeffective dose, the symbol "Gy" is followed after a space by (EquiE / IsoE) in parentheses [ICRU-IAEA, 2007].

The SI (International System of Units) does not accept any subscript, letter or sign added to a unit symbol [BIPM, 2006]. International organisations such the ICRU and IAEA can thus not recommend the units and symbols like "GyE", "Gy(E)" or "CGE".

6 SPECIFIC ISSUES RELATED TO 4D REPORTING²

6.1 Background

Organ motion - and more particularly respiratory motion - affects most tumor sites in the thorax and the abdominal region. Taking into account motion will allow for reduction of irradiated healthy tissues and as a result possible escalation of dose to the target volume. According to the time scale, patient geometry variation is often categorized into interfraction and intrafraction parts. Interfraction variation characterizes the deviation of the average patient geometry at each fraction of treatment from the reference patient model acquired through treatment simulation. Intrafraction variation deals with the change of the instant patient geometry, usually caused by internal organ motion. Because most types of organ motion have non-negligible inter- and intrafraction components, the position of a moving organ can be decomposed into the average position and the instant position relative to the average position. Here we introduce a concept called *daily home position* of a moving organ, which is often the mean position averaged over the fraction. Organ motion has thus an impact on Image-acquisition, CTV-PTV margins and RT delivery.

² This section of the report is based on Bert C, Durante M., Motion in radiotherapy: particle therapy, Phys Med Biol. 2011 Aug 21;56(16):R113-44.

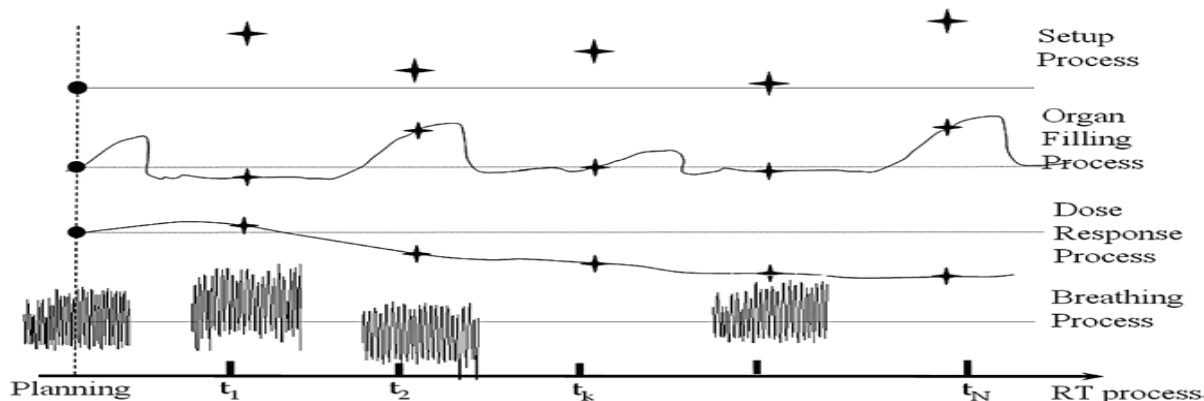


Figure 20: An illustration of some common sources for patient geometry variation during the treatment course. The x-axis represents treatment fraction. The y-axis is the tumor position in a broad sense, including shape change. From Jiang, SB, *Semin Radiat oncol*, 2006

6.1.1 Image-acquisition limitation

Observations of lung tumor motion show that the tumor can follow a complex 3-D trajectory during free-breathing (FB) in addition with the artifacts that result from image acquisition during FB. A single fluoroscopic study can provide detailed two-dimensional (2-D) information on organ motion trajectories and timing/phase shift relationships among different moving structures, but two simultaneous projections (e.g., angiography) are necessary for a complete three-dimensional (3-D) reconstruction of real-time tumor motion. These statements assume that either the anatomy or a suitable surrogate, such as an implanted fiducial marker, can be visualized. A single 2-D projection may lack the sufficient contrast required to recognize out-of-plane motion, rotation, or deformation of the tumor during breathing. Two CT studies acquired at inhale and exhale breath-hold may retrospectively define the full range of tumor motion in three dimensions, but do not provide trajectory or time-profile details for the motion. This method relies on the hypothesis that the geometric relationship between organs during breath-hold being similar to that during FB.

Four-dimensional (4-D) or respiratory correlated CT using single-slice, multi-slice, or cone-beam acquisition can provide 3-D data on tumor position at several points along the breathing cycle with a somewhat reduced spatial resolution, as compared with conventional CT, thus providing a compromise between the good time resolution of a fluoroscopic study and the detailed 3-D information of a CT scan.

Multiple fiducial markers can provide a valuable indicator of tumor rotations and deformation during respiration, which is an issue that has not yet received sufficient attention in discussions of respiratory motion compensation.

Because of the artifacts observed in CT images in which respiratory motion has not been accounted for, the magnitude of margin to allow for respiratory motion is difficult to quantify, particularly for individual patients in whom a wide range of tumor motion is observed. If respiratory motion is not accounted for, as it is the case when conventional RT techniques are applied in thoracic and abdominal sites, it causes artifacts during image acquisition. These artifacts cause distortion of the target volume and incorrect positional and volumetric information during FB.

6.1.2 CTV–PTV margins

The planning target volume (PTV) is a geometrical concept introduced for treatment planning and evaluation and used for dose prescription and reporting in external photon beam RT (see section 2.3.1 above). It is the recommended tool to shape dose distributions to ensure with a clinically acceptable probability that the prescribed dose will actually be delivered to all parts of the CTV. An internal margin (IM) is added for the variations in position and/or shape and size of the CTV and according to the original definition of ICRU62, whatever the probability of presence of CTV in each position inside the ITV. Therefore this original definition of ITV does not take into account the relative time the CTV spends into each position, thus its statistical density associated with its time position probability is not defined. This lack of time scale makes

impossible to calculate the exact dose deposit in and beyond the ITV. This defines the internal target volume (ITV). A set-up margin is added to take into account all the variations/uncertainties in patient-beam positioning. CTV+IM+SM define the planning target volume (PTV) on which the selection of beam size and arrangement is based. IM and SM account for intrafraction motion (due to organ motion) and interfraction motion. The size of the margin has to be chosen carefully; it should be large enough to ensure the delivery of the prescribed dose to a moving target and small enough to keep the normal tissue complications to an acceptable level. Unlike the GTV and CTV concepts that are mainly based on clinical situations and oncological principles the PTV depends also, and to a large extent, on the treatment conditions and technical possibilities.

The following components contribute to the overall geometric error and should be considered when designing CTV–PTV margins:

- i. Respiratory motion and heartbeat during delivery which are quasi-periodic functions of time [Liu, 2007]
- ii. Daily variations of respiratory motion
- iii. Variations caused by changing normal tissues organ shape and volumes and by protocols (e. g. bowel preparations)
- iv. Tumor growth and shrinkage
- v. Treatment-related anatomic changes, such as reductions in bronchiole obstructions and changes in atelectasis regions
- vi. Patient setup error: typical 3-5 mm (1 standard deviation).
- vii. Mechanical uncertainty of the equipment (e. g. sagging of gantry, collimators, and couch)
- viii. Dosimetric uncertainties (e. g. penetration of the beam), transfer errors from CT to the treatment unit
- ix. Human factors

Patients' breathing patterns can vary in magnitude, period, and regularity during imaging and treatment sessions. Systematic changes in the respiratory mean position also occur. Motion also varies markedly between patients, indicating that an individual approach to respiratory management is advised. Accounting for respiratory motion by simply adding treatment margins to cover the limits of motion of the tumor is not recommended, because this increases the radiation field size and consequently the volume of healthy tissues exposed to high doses. It increases the likelihood of treatment-related complications. However, if the margins are not sufficiently large, part of the CTV will not receive adequate dose coverage.

6.1.3 RT delivery deviations (photontherapy)

Radiation delivery in the presence of intrafraction organ motion causes an averaging or blurring of the static dose distribution over the path of the motion. This displacement results in a deviation between the intended and delivered dose distributions. Assuming a static beam, the total positional error affecting the dose is the composite vector of internal (e.g., tumor versus bone) and external (bone versus treatment room) displacements. Thus, for conventional (non-IMRT) treatments, in which the dose gradient in the center of each field can be assumed to be fairly small, the effect is manifested by a blurring of the dose distribution by the anatomy moving near the beam edges, increasing the beam penumbra. This effect is thought to be exacerbated during IMRT delivery, causing motion artifacts in dose distribution due to the interplay between motion of the leaves of a multileaf collimator (MLC) and the component of target motion perpendicular to the beam.

6.2 Photon therapy practice

The methods that have been developed to reduce the impact of respiratory motion in photon RT can be broadly separated into five major categories: motion-encompassing methods, respiratory-gating techniques, breath-hold techniques, forced shallow-breathing techniques, and respiration-synchronized techniques.

6.2.1 Motion-encompassing methods

Since tumor motion will be present during radiation delivery, it is important to estimate the mean position and range of motion during CT imaging. The three techniques possible for CT imaging that can include the

entire range of tumor motion for respiration (at the time of CT acquisition) are i) slow CT, ii) inhale and exhale breath-hold CT, and iii) four dimensional (4-D) or respiration-correlated CT.

- i. In the slow-scanning method, the CT scanner is operated very slowly, and/or multiple CT scans are averaged such that multiple respiration phases are recorded per slice.
- ii. Inhale and exhale gated or breath-hold CT scans are acquired during the CT simulation session. By fusing the two scans and using the maximum intensity projection (MIP) tool available in most visualization systems the tumor-motion-encompassing volume is obtained.
- iii. High-quality CT data in the presence of respiratory motion are performed with 4-D CT or respiration-correlated CT (conventional and cone-beam approaches). Four-dimensional data (3 geometrical D plus time) can be analyzed to determine the mean tumor position (or the most probable position i.e. the modal position), tumor range of motion for treatment planning, and the relation of tumor trajectory to other organs and to a respiration monitor. Images are acquired at each couch translation position for many respiratory phases. The image acquisition is synchronized with the respiratory signal acquisition, allowing all images of a particular stage of the respiratory cycle to be reconstructed into a complete 3-D CT image.
 - All of the phases put together make up a 4-D CT data set on which the whole extent of the tumor motion across the respiratory cycle appears. An internal GTV (IGTV), i.e. the union of the GTVs of all motion phases which can be expanded by margins for the microscopic spread of the disease to form an internal target volume (ITV) [ICRU 62, p8]. ITV can be drawn on each slice or on a single MIP when there is a large Hounsfield unit (HU) difference between a tumor and the surrounding normal tissue. In this case we only have the maximum density everywhere in the ITV.
 - Alternatively, ITV generation can be achieved by combining the CTV contours of the individual motion phases. This technique is able to reintroduce the time into the ITV definition, making then possible to define time-weighted positions into the ITV ranging from about 100% to 0% on the edges.
 - Another alternative is to get a selected single artifact-free 3-D CT scan slice from the 4D data set - with tumor closest to the mean position (or the most probable position), time-averaged - may be reconstructed and used for RT planning. The GTV and CTV are delineated and a “reasonable” isotropic margin may be added according to the formulas to get the PTV (e.g. NKI formula)[van Herk, 2000]. This way the time weighted positions are ranging from about 100% to a “reasonable” percentage.

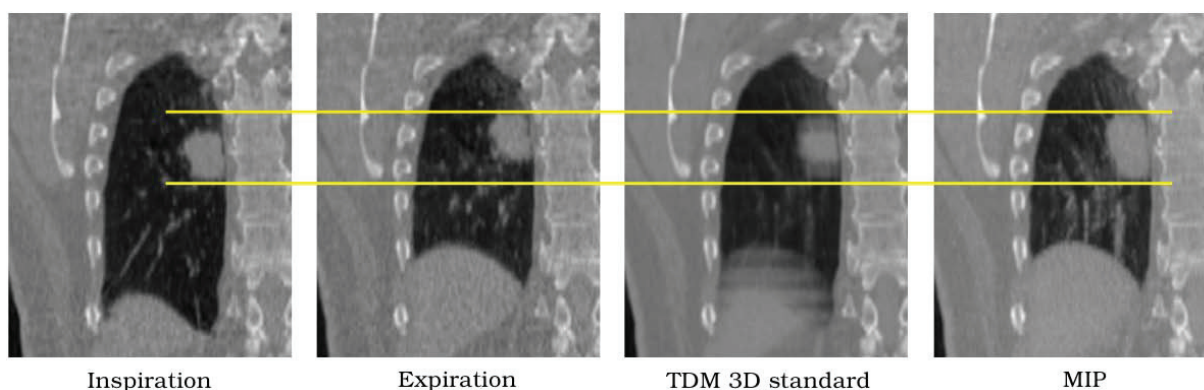


Figure 21: An illustration of imaging of tumor motion, from G.Bouihol PhD thesis.

6.2.2 Respiratory gating methods

Respiratory gating involves the administration of radiation (during both imaging and treatment delivery) within a particular portion of the patient’s breathing cycle, commonly referred to as the “gate” - thereby increasing the potential for CTV–PTV margin reduction. The position and width of the gate within a respiratory cycle are determined by monitoring the patient’s respiratory motion, using either an external respiration signal or internal fiducial markers. Respiratory motion can be characterized by two variables that

are recorded as part of the respiration signal or the motion of the internal anatomy. These variables are displacement and phase. The displacement of the respiration signal measures its relative position between two extremes of breathing motion, namely, inhale and exhale. In displacement-based gating, the radiation beam is activated whenever the respiration signal is within a pre-set window of relative positions. Phase illustrates the cyclic feature of breathing defined by the periodicity. A complete breathing cycle corresponds with a phase interval from 0 to 2π . In phase-based gating, the radiation beam is activated when the phase of the respiration signal is within a pre-set phase window. Typically, a gate extends over a region of the breathing cycle where the motion of the tumor is estimated to be less, compared with the rest of the respiratory cycle (such as at exhale), or where the lung volume is maximal (such as at inhale). The ratio of the time spent by the signal within the gate to the overall treatment time is referred to as the duty cycle and is a measure of the efficiency of the method. Some tumor motion still occurs within the gate and is referred to as “residual motion.”

6.2.3 Breath-hold methods

Patients are treated in a specific and reproducible artificial plateau phase of the respiratory cycle (moderate or deep inhale) where tumor motion and internal anatomy are significantly reduced to spare critical normal tissues. The patient breathes through a mouthpiece connected via flexible tubing to a spirometer. The breath-hold duration is patient dependent, typically 15 to 30 seconds, requiring breathing training of the selected patients. Several methods are used:

- i. Active-breathing control (ABC) where the patient breathes normally through the apparatus. When an operator “activates” the system, the lung volume and the breathing cycle stage at which a balloon valve will be closed are specified (usually 75% of deep inhale). Then the valve is inflated with an air compressor for a pre-defined duration of time, thereby “holding” the patient’s breath.
- ii. Deep-inspiration breath-hold (DIBH). DIBH is a controlled breathing technique in which the patient performs a supervised breath hold during treatment. The technique offers 2 benefits: reduced respiratory motion from the breath hold and increased normal tissue sparing from the increased lung volume
- iii. Self-held breath-hold with or without respiratory monitoring. The patient voluntarily holds his/her breath at some point in the breathing cycle. During a breath-hold, the beam is turned on when the patient presses a hand-held switch, and the dose is delivered to the tumor. When the switch is released, the beam is turned off and any further delivery is disabled until the switch is pressed again.

6.2.4 Forced shallow breathing with abdominal compression

The technique employs a stereotactic body frame with an attached plate that is pressed against the abdomen. The applied pressure to the abdomen reduces diaphragmatic excursions, while still permitting limited normal respiration.

6.2.5 Real-time tumor-tracking methods

RTTT aims to reposition the radiation beam dynamically so as to follow the tumor’s changing position. It can in principle be achieved by using a MLC or a linear accelerator attached to a robotic arm or, alternatively, by aligning the tumor to the beam via couch motion. Under ideal conditions, continuous real time tracking can eliminate the need for a tumor-motion margin in the dose distribution, while maintaining a 100% duty cycle for efficient dose delivery. To succeed, this method should be able to do four things:

- i. **identify the tumor position in real time**; Four methods are available: (a) real-time imaging of the tumor itself via, e.g., fluoroscopy acquired during treatment; (b) real-time imaging of artificial fiducial markers implanted in the tumor. Three or more fiducial markers allow measurement of tumor translation and rotation, and marker migration can be inferred by monitoring the distance between markers; (c) inference of the tumor position from surrogate breathing motion signals. To succeed, this technique requires that there be a robust correlation between the measured respiratory signal and the position of the tumor in three dimensions; (d) non radiographic tracking of an active or passive signaling device implanted in the tumor;
- ii. **anticipate the tumor motion** to allow for time delays in the response of the beam-positioning system. (ULICE JRA WP4.9) The presence of a time delay requires that the tumor position be

predicted in advance, so that the beam can be synchronized to arrive at the actual position of the tumor once the adjustment has been made. This is necessary regardless of the method by which the tumor position is determined and applies to both beam gating and real-time tracking systems. The problem is complicated by the fact that a typical human breathing cycle, while nominally periodic, has significant cycle-to-cycle fluctuations in tumor displacement, as well as longer-term fluctuations in both displacement and frequency. However, these fluctuations are not purely random which means that it should be possible to predict the character of a particular breath from the observed characteristics of the previous intrafractional breathing cycles;

iii. reposition the beam; there are presently two methods by which the treatment beam can be repositioned in real time in response to tumor motion. The first one is MLC repositioning. The second method for adaptation uses a robotic manipulator to move the entire linear accelerator with 6 degrees of freedom.

iv. adapt the dosimetry to allow for changing lung volume and critical structure locations during the breathing cycle. The treatment-planning imaging study used to calculate the dosimetry necessarily captures the anatomy in one static configuration, whereas during breathing, the anatomy and the air volume in the lung are continuously changing. This perturbs the attenuation of the treatment beam and changes the relative positions of tumor, normal tissue, and critical structures.

6.3 Particle therapy specific issues

Organ motion reduction and organ stabilization, positioning and motion monitoring are similar to the ones developed in photon radiotherapy. However some issues are specific to particle therapy. While a single isotropic geometrical margin has to be added around the CTV with photon beams, delineation of the PTV needs a different approach for proton and carbon beam therapy due to their finite penetration range. Uncertainties in range depend on many factors such as errors in conversion between Hounsfield numbers and stopping power, artifacts in CT reconstructions etc. A quantitative study by analyzing the 4D CT data of 11 patients with lung tumors was performed. The authors found range fluctuations up to 21.8 mm water-equivalent over the breathing cycle of these patients [Mori 2008]. Similar fluctuations were described by the same group with heartbeat motion [Mori 2007].

An error in positioning the target may not be simply corrected by properly reposition the patient. Even if the CTV is correctly repositioned, it will not have the same relationship with the surrounding tissues and therefore the range of particles will be changed resulting in errors in the delivered dose. Small rotations may bring a lot of tissue in or out the beam path. Weight loss or gain and tumor shrinkage may have the same undesirable consequences. In summary two types of uncertainties occur with particle therapy in two different directions related to the axis of the beam. Perpendicularly, lateral penumbra requires the aperture to be adapted to the periphery of the CTV, as for photon beam. Along the beam axis, the energy range should fit with the dose depth distribution. These two types of margins are linked to the position of each beam. They are both influenced by organ motion and are of completely different nature. Therefore they are technically difficult to be combined for the definition of a unique PTV [ICRU 1999, p.11; ICRU 2007, p.86].

6.3.1 Beam scanning.

Here the PTV is decomposed into voxels, actively and sequentially irradiated with a native pencil beam whose energy is modulated. The scanning process delivers the pencil beams according to a coordinate system bound to the room, over a given time. Target motion then changes the relative positions between pencil beams in the target volume. The result is a deteriorated dose distribution due to a so-called interplay effect. Conformal dose distributions can be achieved by optimizing both the number and the incidence of the beams. Changes in the range of every pencil beam, mainly in presence of complex inhomogeneities and interplay effects must be taken into account, especially for moving organs.

With an intestinal crypt cell assay, Gueulette elegantly showed in mice that with a scanning proton beam, movement of the small intestine in relation to the (rather slow) movement of the pencil beam could result in regions of the intestine being significantly under or over irradiated [Gueulette 2005]. This illustrates that the use of IMPT may increase the probability of the interplay effect, resulting in regions of higher or lower dose within the PTV [Kissick 2005].

Lomax studied the impact of inter-field motion in IMPT with a scanned proton beam. For a 5 mm shift of the dose distribution, he reported considerable under-dosage (up to 20%) within the CTV [Lomax 2008]. The first simulation studies for patient geometries were performed by Bert and confirmed the risk of under-dosage reported in the numerous studies mentioned above. [Bert 2008]

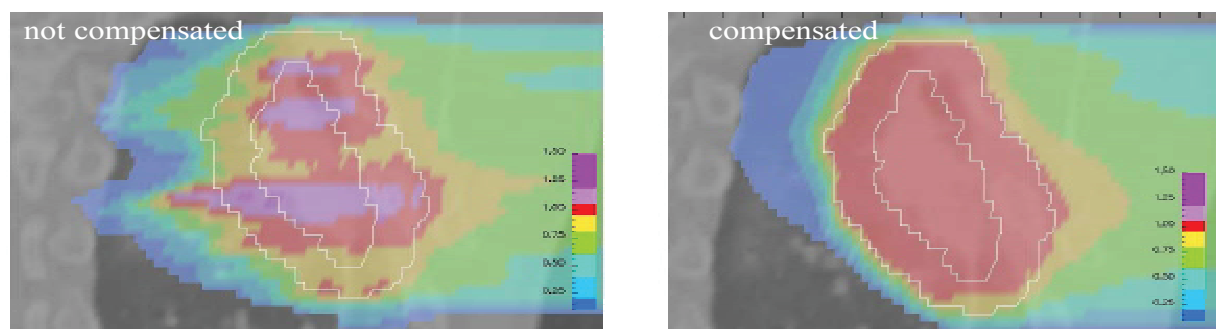


Figure 22: Illustration of organ motion compensation at GSI on a lung tumor

Despite using margins to take into account the effect of the changing radiological path length, CTV coverage could not be achieved in a 4D treatment planning study using 12 different motion parameters as lung motion surrogate [Lujan, 1999]. Over all five patients studied and all motion parameter combinations, the mean coverage of the CTV with at least 95% of the prescribed dose was 71% (SD 14.2) with a minimal coverage of 25.7% and a maximum coverage of 99.8%.

With active scanning under-dosage of the CTV occurs even if margins are used, because of the interplay effect that takes place inside the CTV.

6.3.2 Passive scattering

On the contrary with beam scattering the whole PTV is passively irradiated in the same time - using patient-specific absorbers and collimators - so that the whole CTV is always covered if appropriate (anisotropic) margins are applied. Thus in scattered beam treatments, the use of margins is sufficient to ensure dose coverage of the CTV if the range influence is addressed.

The situation is similar to photon beams however the previous remark regarding the difficulty to combine margins remains true.

6.4 Motion management and technological solutions (JRA.WP4)

6.4.1 Separating tumors according to the importance of motion

In case of slightly moving tumors (head & neck, spine, pelvis, limbs), including with an adequate immobilization, a stationary delivery and margins-based approach (ITV) can be performed. For tumors having more important motion (lung and liver tumors) techniques that reduce the motion amplitude are used.

6.4.2 Gating for reducing the motion amplitude

Gating has been used on several sites influenced by respiratory motion [Lu 2007] with an emphasized use for lung cancer [Iwata 2010, Miyamoto 2003, and Nihei 2006] and hepatocellular lesions [Chiba 2005, Hashimoto 2006, and Kato 2004]. The size of the gating window determines the residual motion and the needed margins to cover it. Gating is not yet used at centers with a scanned beam for two reasons: i) the interruption of the beam scanning will lead to potential errors on the position where to resume the delivery; ii) the under/over-dosage related to interference effects with the residual motion. Moreover, multiple beam on/off cycles have to be supported by the accelerator and energy-selection system. Abdominal compression or breath hold has also been used. Currently only one center treats intra-fractionally moving tumors with a scanned beam using apnea under intubation and anesthesia.

6.4.3 Apply adapted margins

With 4D treatment planning any voxel can be tracked from one motion phase into any other phase of the 4D data set permitting 4D plan optimization and dose calculation on a deformable registration maps. However particle therapy centers currently do not use 4D CTs for treatment of lung tumors. Most centers rely on a FB-CT and determine margins based on data from the literature or fluoroscopy of the individual patient [Bush 2004, Mayahara 2007, Nihei 2005, and Tsuji 2005]. In the case of gated treatments, the FB-CT is substituted by a gated CT [Minohara 2000 and Nihei 2006].

To apply adapted margins, target volumes and relevant OARs are imaged in different inter-fractional motion states, by performing multiple CT scans. Then, by contouring of the target volumes on each scan and selecting those target voxels that are included in a certain proportion of the different scans, one realized a time-averaged volume definition according to 6.2.1 (2nd§). For instance 3–5 CT scans are acquired and used to form a patient-specific PTV by contouring of the target volumes on each scan and selecting those target voxels that are included in at least two of the individual target contours [Nikoghosyan 2004].

Incorporation of the uncertainties in the particle beam range is field specific and not tumor volume specific since the uncertainties change with the beam portal and conditions along the path between the port and the tumor. The effect of range uncertainties is not restricted to organ motion, but happens also with static targets due to tissue density uncertainties. For passively shaped beams, margins in depth are generated by a reduced thickness of compensator material that results in a distal shift of the dose distribution. An additional increase of the modulation is required if the proximal contour of the dose distribution should remain stable or even more shifted. For scanned beams, margins definition and motion mitigation techniques are both required. The concept of maximum range projection per voxel derived from MIP and incorporates not only maximum radiological range but also the minimal range at the proximal side of the target volume [Bert 2007] (See figure below).

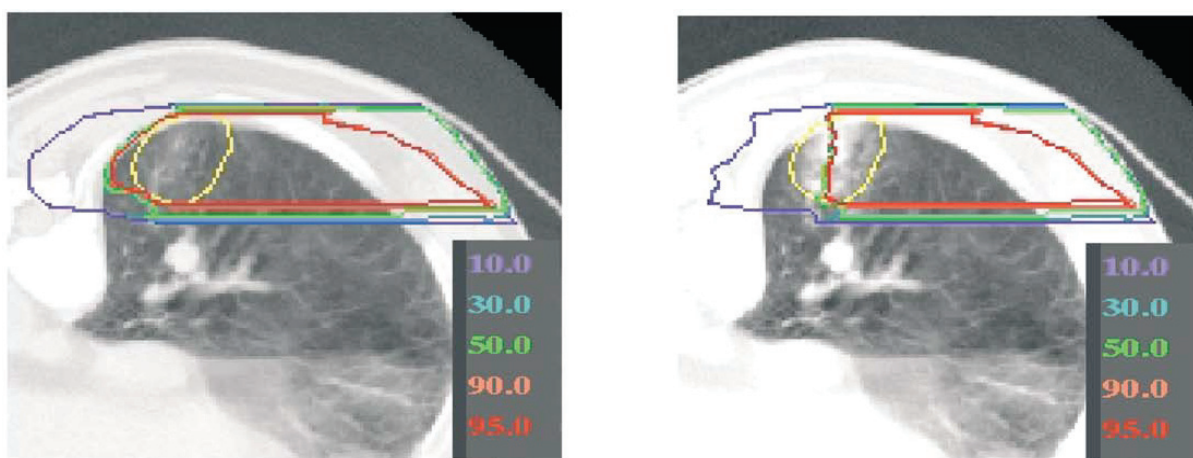


Figure 23: The finite penetration range of charged particles has a clinically very relevant dependency on the density of all tissues crossed by the beam in its path so that a dense lung nodule (yellow contour) displaced during breathing may be replaced by less dense lung parenchyma on a given CT slice. As a result the treatment plan would not be longer available since that nodule may have been displaced out of a geometrical PTV (underdosed) and health tissue may be irradiated with high biologically active particles [Koto 2004].

Interfraction modification of tumor mass is an additional source of target position uncertainty. To take it into account, adaptive radiotherapy is already performed for cervical cancer at NIRS [Kato 2006]. Based on the repeat planning CTs, the CTV was shrunk step by step to prevent major late gastrointestinal toxicities.

6.4.4 Beam scanning:

To compensate for the interplay effect, rescanning and beam tracking are evaluated and may be used. Motion amplitude and speed are the parameters that determine the magnitude of interplay effects.

i. Rescanning/repainting.

Rescanning is based on multiple irradiations of the PTV per treatment fraction with a proportionally reduced dose [Phillips 1992]. Multiple scans will thus lead to an averaging effect of the interference pattern if it can be ensured that the motion parameters are slightly different in each rescan. If a sufficient number of rescans is applied, the averaging effect will lead to homogeneous dose coverage of the CTV and a blurred dose distribution in the region of the internal margins. The core techniques are rescanning energy slice by energy slice (slice-by-slice rescanning also called level repainting or non-volumetric repainting) and rescanning of the volume (volumetric rescanning or uniform repainting). Volumetric rescanning will not be applicable in synchrotron-based facilities with the current methods of active energy variation since these need several seconds to change the energy of the beam. In a typical case of 50 energy slices and 10 rescans, the integral time to change the energy takes longer than the total room occupation time usually planned. One of the main concerns of rescanning is synchronism between delivery and organ motion jeopardizing the averaging effect since motion parameters no longer change in between rescans [Rietzel 2010]. Scanning planes should be perpendicular to the motion direction and the iso-energy slices scanning should be slow enough. Actually the slice scanning is the slowest of the three scan directions in the currently implemented facilities. A more elegant although even more complex alternative to ensure irradiations averaged over the motion cycle can be achieved by incorporating the respiration pattern in the rescanning process. By using the data from a motion-monitoring system in combination with a modulated dose rate, it is possible to spread the rescans throughout the respiration period [Furukawa 2007]. An effect similar to rescanning can be reached by using multiple fields for treatment delivery. In principle, multiple fields are comparable to volumetric rescanning with a change of beam portals that might be beneficial since proximal and distal regions compensate in the case of opposing fields.

ii. Tracking.

Here the motion of the CTV is compensated such that reduced internal margins are required. In addition to lateral penumbra, changes in radiological pathlength have also to be compensated for. However in the case of heterogeneous tissues density in front or inside the CTV, beam tracking had negative influence on the dose homogeneity within the target volume and did not restore the outcome of the simulation for a stationary target [Bert 2010].

6.4.5 ULICE-WP4 contribution

The goal of ULICE-WP4 is the development of a demonstrator for tracking at CNAO and the implementation of rescanning at HIT – both requiring dedicated changes of the radiotherapy chain. WP 4.1 describes the moving patient geometry by means of 4D computed tomography, motion models, and deformation maps. The goal of WP 4.2 was the development of a monitoring system which most likely comprises motion models that can be used at HIT, CNAO, and the future centers. The main goal of WP 4.3 was a prototype implementation at CNAO, which requires prototype design and development as well as adaptation of the treatment control system. As an alternative to tracking, HIT will develop rescanning. In principle, rescanning is less favorable than tracking because the normal tissue burden is increased but since its robustness to changes in e.g. breathing pattern is much better compared to tracking an early clinical use that would be beneficial for a subset of patients is likely. Last but not least workflow and quality assurance concepts will be developed (WP 4.5) which play a very important role for the clinical implementation of 4D ion radiotherapy.

Deliverables of WP4

- 4D deformation model for generation of reference data
- Prototype of optical tracking system based on external markers and surface detection
- 4D deformation model with adaptation to daily data
- Motion model demonstrating internal-external correlation

- Lateral compensation strategy based on motion monitoring signal
- Rescanning component of UKL-HD treatment control system
- Strategies demonstrating the integration of optical tracking with in-room 2-D, 3-D, 4-D imaging and 4-D dose delivery
- Combined internal/external motion monitoring
- Lateral and longitudinal compensation based on monitoring signal
- Overview and comparison of existing workflow concepts for 4D radiotherapy
- Guideline document on QA and workflow aspects (incl. radiation protection) for 4D ion beam therapy
- Rescanning prototype validation

6.5 Recommendations for prescribing and reporting

Regarding volumes, PTV:

ICRU report 78 [ICRU 2007, p.86) recommends some margin in depth to be left to allow for uncertainties in the distal edge of the PTV in addition to the lateral margins. Thus these two margins solve different issues and will virtually always be numerically different. As a consequence for technical reasons, at the present time, it is difficult to delineate the PTV. Therefore for each beam orientation being considered, one would need a separate PTV with different margins laterally and along the direction of the beam.

However, if we consider that the PTV is only defined by the addition to the CTV of all the positional and anatomic uncertainties (motion, shape, tissues composition, repositioning and set-up, etc) one could consider in principle a unique PTV for each CTV. When designing the treatment and choosing the beams, additional uncertainties related to tissue characteristics, beam and radiation qualities will appear and determine the parameters to compute in the treatment plan that is transferred to the accelerator. Each beam will need a specific treatment plan to contribute to the irradiation according to the prescription.

There is at present no way to prescribe a simultaneously optimized multiportal particle treatment with portal specific PTV. If one field per day is delivered the above-described approach can be used. The same holds true if multiple fields per day are employed but each of them is optimized singularly.

Regarding dose report, DVH:

If multiple PTVs are employed it would be unpractical to report and prescribe dose separately. The addition of all these plans will constitute the irradiation of the PTV, represented by the DVH.

Existing optimization algorithm can be applied to a CTV but the resulting plan will not be very robust against any change. In Intensity Modulated Particle Therapy (IMPT), small pencil beams of different energies are guided over a three-dimensional target volume dissected into 'voxels'. By modulating the beam fluency of the different voxels a homogeneous biological effect over the target volume can be reached with a simultaneous optimization of several treatment fields, each delivering an inhomogeneous dose to the target. The sum will be equal to the prescription dose but will be obtained in different ways in each voxel. Usually 2 ports are sufficient for a conformal treatment. New algorithms with uncertainties oriented optimization should be investigated for IMPT, in the meanwhile single PTV should be employed for IMPT but resulting plans should be checked for robustness against deviations between planning and treatment conditions.

Introduction of 4D CT:

CTV may be imaged on several FB conditions. A global treatment plan can be calculated in each condition. The summation of all the plans to a single simulation CT data set will result in a Treated Volume (TV) larger than the CTV. In this situation DVH for each breathing phase can be produced and a cumulative DVH may be reported on a static reference slice (mid position?), thus overestimating the dose deposited laterally. Advanced concepts of DVH could emerge in the future to address this situation: dose-mass histogram rather than DVH, probabilistic DVH with confidence interval of CTV-DVH, ...

CONCLUSION

In carbon ion-beam therapy the same volume concepts can be adopted as those currently applied in conventional photon and proton-beam therapy. They were defined in several ICRU Reports (ICRU 1993, 1999, 2007). Distinction between volume concepts based (mainly) on oncologic knowledge (i.e., GTV, CTV) and those related (mainly) on technical constraints (e.g., PTV) should be further emphasized. However it is recognised that in medical sciences it is not always possible to define strict limits between different concepts, definitions and patient groups/staging.

The reasons of evolution or progress in these concepts are different, medical and diagnostics for the first ones, technological and conceptual for the latter.

The definition of the planning target volume (PTV) but mainly its clinical application (delineation) raises issues that are specific to particle-beam therapy (see above the full definition/discussion of the PTV in section 2.3.2). The PTV is defined as the volume planned to be irradiated at the appropriate dose in order to ensure that all parts of the CTV receive the prescribed dose. Uncertainties exist at the level of the delineated CTV; their importance largely depend on the tumour location and clinical situation; it is a clinical/oncological issue which requires the judgment/expertise of the radiation oncologist in charge.

Thus the delineation of the PTV should account for two types of uncertainties:

1. Movements (physiological), changes in size and shape and position of the CTV within the patient (they could influence the surrounding normal tissues and OARs). To take into account this first set of uncertainties, *the internal margin* is added to the CTV. Little can be done to reduce these uncertainties: better preparation and clear instruction to the patient.

The combination of the internal margin and the CTV defines the *Internal Target Volume (ITV)*. The ITV was introduced in several ICRU reports in photon beam therapy (ICRU, 1999 and 2004), although its current use was not strictly recommended in all reports. Actually interesting improvement of ITV are possible as the weighted margins. Because the ITV is defined mainly on physiological/medical bases it is rather similar for all irradiation techniques.

2. Uncertainties in target-beam positioning. In contrast to the uncertainties on ITV, uncertainties on target-beam positioning are specific to the irradiation techniques and largely related to the technical constraints. In principle, selective beam qualities (e.g., protons) and accurate delivery techniques (e.g., IMRT) reduce these uncertainties. Different techniques thus result in different PTV delineation. The set-up margin is planned to compensate for these uncertainties.

Delineation of the ITV can thus be considered as an intermediate step from the CTV to the PTV.

However, delineation of the PTV for particle beams (protons, ions) raises specific issues. On the one hand, for a given beam the set-up margin perpendicular to the beam axis depends on the accuracy in beam positioning/orientation and patient immobilization precautions. On the other hand, the set-up margin along the beam axis depends on the accuracy in beam penetration, i.e., energy, tissue density, etc. When two (or more) non-parallel opposed particle beams are applied, delineation of the (unique) PTV would imply combination of two types of uncertainties and raise complex computation issues (algorithms). Therefore for the time being it has been recommended to report separately the PTV for each beam (ICRU-IAEA, Report on proton beams, ICRU 2007).

The characteristics of each beam to treat the PTV should be adapted to it, including the incidence under which it is reached but also the nature (density and atomic composition) and movement of tissues which are along the beam path, quite independently of the target itself. These parameters then bringing their own uncertainties that will be added to those of the PTV to define each beam. For example the uncertainty in the density of tissue located before the PTV will impose an appropriate choice of the maximum energy of particles, and will therefore influence the irradiated volume quite specifically according of the type of beam. This alteration will be mild with photons and significant for charged particles.

Thus, given the variety and the fast improvement of particle therapy techniques (passive diffusion, active or semi active control, available incidences, etc.) it would be preferable to distinguish between the PTV, related to patient characteristics, its mobilization or control when moving on one hand and the additional constraints imposed by the available treatment technologies.

Concepts for defining and reporting dose have improved recently with the general availability of DVH which appears as the basic tool to report dose to target volumes and OAR. However three adaptations are needed, first the reference doses to assess the quality of the dose distribution (D_{max} , D_{min} , ICRU ref) have to be adapted to be obtained through the DVH (D_{02} , D_{98} , D_{50} , respectively); second a relevant anatomical information linked to the DVH should be produced and third the very complex issue of biologically effective dose due to the variation of RBE should at least be conservatively handled by the use of a clear notation using Isoeffective and Equieffective dose concepts (D_{IsoE} , D_{EquiE}), as long as the carefully recording of the basic physical parameters of the treatments.

In the present state of knowledge and techniques, established concepts are well suited to treat immobile tumors in a stationary environment. Moreover, the tumors of which we can master the movement, either by efficiently preventing it during the beam shot, or by modelling it adequately, can truly be treated by techniques which only the margins and distance are influenced by the uncertainties of position, but not the internal homogeneity of dose deposition. This is true of all types of beams that have a physical continuity and homogeneity of the irradiated volume at any time. This is the case for X-ray beams, electron beams and passively scattered charged particles.

It is different for the beams that are inherently heterogeneous in time and space as those produced by active control techniques (beam scanning, raster scanning, spot scanning). Whatever the residual movements, able to be modeled or not, the currently available means of quality control of the dose distribution do not guarantee an absence of overdosing and even more underdosing in the PTV. So whatever the techniques used, this remains in the domain of research and development

Two issues are thus crucial in this area:

- first, the techniques of motion compensation (repainting, tracking, etc.), which are very sophisticated but with promising results;
- second, the techniques of quality control which are neither available yet nor having an expected level of precision able to ensure, a real-time or deferred time, quality of dose deposition in tissues (and not only the quality of the particle distribution in space). Indeed a dose heterogeneity of a millimeter scale and several% is not yet measurable, by far. This aspect is certainly the most limiting one for the implementation of active beam techniques for treating mobile tumors.

This underscores the relevance of particle beam therapy techniques that would be less sensitive to the movements of the target to enlarge the scope of therapeutic indications.

Finally, the most universal approach for mastering the uncertainty of position of CTV remains for now an adaptation of the safety margins around the CTV to define the PTV. In this area the concept of weighted margins according to the probability of presence of the target is a major step for the protection of organs at risk. Works and future studies should concentrate on defining for particle therapy the different modalities of this weighting with ballistic and biological dimensions and to define probability thresholds to associate with the dose prescription.

REFERENCES

- [AJCC 2010] AJCC Cancer Staging Manual 7th ed. 2010, Editor S. B. Edge et al., Springer 2010
- [Bert 2007] Bert C, Rietzel E. 4D treatment planning for scanned ion beams. *Radiat Oncol.* 2007 Jul 3;2:24.
- [Bert 2008] Bert C, Grözinger SO, Rietzel E. Quantification of interplay effects of scanned particle beams and moving targets. *Phys Med Biol.* 2008 May 7;53(9):2253-65.
- [Bert 2010] Bert C, Gemmel A, Saito N, Chaudhri N, Schardt D, Durante M, Kraft G, Rietzel E. Dosimetric precision of an ion beam tracking system. *Radiat Oncol.* 2010 Jun 30;5:61.
- [BIPM 2006] Bureau International des Poids et Mesures, The International System of Units (SI), 8th Edition, BIPM, 92312 Sèvres Cedex, 2006
- [Bush 2004] Bush DA, Slater JD, Shin BB, Cheek G, Miller DW, Slater JM. Hypofractionated proton beam radiotherapy for stage I lung cancer. *Chest.* 2004 Oct;126(4):1198-203.
- [Brenner, 1998] Brenner D J, Hlatky L R, Hahnfeldt P J, Huang Y and Sachs R K 1998 The linear–quadratic model and most other common radiobiological models result in similar predictions of time-dose relationships *Radiat. Res.* 150 83–91
- [Brenner, 1999] Brenner DJ, Hall EJ. Fractionation and protraction for radiotherapy of prostate carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1999;43:1095–1101
- [Chiba 2005] Chiba T, Tokuyue K, Matsuzaki Y, Sugahara S, Chuganji Y, Kagei K, Shoda J, Hata M, Abei M, Igaki H, Tanaka N, Akine Y. Proton beam therapy for hepatocellular carcinoma: a retrospective review of 162 patients. *Clin Cancer Res.* 2005 May 15;11(10):3799-805.
- [CNAO 2010] Fondazione Centro Nazionale Adroterapia Oncologica, Proceedings of II NIRS-CNAO Joint Symposium on Hadrontherapy (NIRS Experience), 27100 Pavia, Italy, 2010
- [Cox 1995] 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). *International journal of radiation oncology, biology, physics,* 1995, 31 (5), 1341-1346
- [Furukawa, 2007] Furukawa T, Inaniwa T, Sato S, Tomitani T, Minohara S, Noda K, Kanai T. Design study of a raster scanning system for moving target irradiation in heavy-ion radiotherapy. *Med Phys.* 2007 Mar;34(3):1085-97.
- [Gueulette, 1998] Gueulette J, Menzel HG, Pihet P, Wambersie A. Specification of radiation quality in fast neutron therapy: microdosimetric and radiobiological approach. *Recent Results Cancer Res.* 1998;150:31-53.
- [Gueulette 2005] Gueulette J, Blattmann H, Pedroni E, Coray A, De Coster BM, Mahy P, Wambersie A, Goitein G. Relative biologic effectiveness determination in mouse intestine for scanning proton beam at Paul Scherrer Institute, Switzerland. Influence of motion. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005 Jul 1;62(3):838-45.
- [Hall 1991] Hall, E. J., Weiss lecture. The dose-rate factor in radiation biology. *International journal of radiation biology,* Mar. 1991, 59 (3), 595-610.
- [Hashimoto , 2006] Hashimoto T, Tokuyue K, Fukumitsu N, Igaki H, Hata M, Kagei K, Sugahara S, Ohara K, Matsuzaki Y, Akine Y. Repeated proton beam therapy for hepatocellular carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006 May 1;65(1):196-202.
- [IAEA 2007] International Atomic Energy Agency and International Commission on Radiation Units and Measurements, Dose reporting in ion-beam therapy, Joint IAEA-ICRU report, IAEA-TECDOC-1560, IAEA, Vienna, Austria, 2007
- [IAEA 2008] International Atomic Energy Agency and International Commission on Radiation Units and Measurements, Relative Biological Effectiveness in Ion-Beam Therapy, Joint IAEA-ICRU report, IAEA-Technical Report Series 461, IAEA, Vienna, Austria, 2008.
- [ICRP 1991] International Commission on Radiological Protection, 1990 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection, *Annals of the ICRP,* Vol 21, Pergamon Press, 1991.

[ICRP 1963] International Commission on Radiological Protection, Report of the RBE Subcommittee to the International Commission on Radiological Protection and the International Commission on Radiation Units and Measurements, 1962, Health Physics, 9, 357-386, 1963

[ICRU 1978] International Commission on Radiation Units and Measurements, Dose specification for reporting external beam therapy with photons and electrons. ICRU Report **29**, Bethesda-Maryland, USA, 1978

[ICRU 1979] **30**

[ICRU 1984] International Commission on Radiation Units and Measurements, Radiation dosimetry: electron beams with energies between 1 and 50 MeV, ICRU Report **35**, Woodmont Avenue, Bethesda, Maryland, 20814, USA, 1984

[ICRU 1993] International Commission on Radiation Units and Measurements, ICRU Report **50**, Prescribing, Recording, and Reporting Photon Beam Therapy, Oxford University Press, 1993.

[ICRU 1998] International Commission on Radiation Units and Measurements, Fundamental quantities and units for ionizing radiation, ICRU Report **60**, Woodmont Avenue, Bethesda, Maryland, 20814-3095, USA, 1998

[ICRU 1999] International Commission on Radiation Units and Measurements, ICRU Report **62**, Prescribing, Recording and Reporting Photon Beam Therapy (Supplement to ICRU Report 50), Oxford University Press, 1999.

[ICRU 2004] International Commission on Radiation Units and Measurements, ICRU Report **71**, Prescribing, Recording, and Reporting Electron Beam Therapy, Oxford University Press, Vol 4, Nr. 1, 2004.

[ICRU 2007] International Commission on Radiation Units and Measurements and International Atomic Energy Agency, ICRU Report 78, Prescribing, Recording, and Reporting Proton-Beam Therapy, Joint ICRU-IAEA Report **78**, Journal of the ICRU, Oxford University Press, Vol 7, Nr. 2, 2007.

[ICRU 2010] International Commission on Radiation Units and Measurements, ICRU Report **83**, Prescribing, recording and reporting Photon-Beam Intensity-Modulated Radiation Therapy (IMRT), Oxford University Press, Vol 10, Nr. 1, 2010.

[ICRU 2012] International Commission on Radiation Units and Measurements and Groupe Européen de Curiethérapie - ESTRO, Prescribing, recording and reporting brachytherapy for cervix cancer treatment, Joint ICRU-GEC-ESTRO Report, Journal of the ICRU **86**, Vol 12, N° 1, 2012

[Iwata, 2010] Iwata H, Murakami M, Demizu Y, Miyawaki D, Terashima K, Niwa Y, Mima M, Akagi T, Hishikawa Y, Shibamoto Y. High-dose proton therapy and carbon-ion therapy for stage I nonsmall cell lung cancer. Cancer. 2010 May 15;116(10):2476-85.

[Joiner 2009] M. Joiner and A. van der Kogel (Eds), Basic clinical radiobiology, Hodder Arnold, UK, 2009.

[Kase 2011] Yuki Kase, , Tatsuki Kanai, Makoto Sakama, Yuji Tameshige, Takeshi Himukai, Hiroyuki Nose, and Naruhiro Matsufuji, Microdosimetric approach to NIRS-defined biological dose measurement for carbon-ion treatment beam, J. Radiat. Res., 52, 59–68 (2011)

[Kato 2004] Kato H, Tsujii H, Miyamoto T, Mizoe JE, Kamada T, Tsuji H, Yamada S, Kandatsu S, Yoshikawa K, Obata T, Ezawa H, Morita S, Tomizawa M, Morimoto N, Fujita J, Ohto M; Liver Cancer Working Group. Results of the first prospective study of carbon ion radiotherapy for hepatocellular carcinoma with liver cirrhosis. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2004 Aug 1;59(5):1468-76.

[Kato 2006] Kato S, Ohno T, Tsujii H, Nakano T, Mizoe JE, Kamada T, Miyamoto T, Tsuji H, Kato H, Yamada S, Kandatsu S, Yoshikawa K, Ezawa H, Suzuki M; Working Group of the Gynecological Tumor. Dose escalation study of carbon ion radiotherapy for locally advanced carcinoma of the uterine cervix. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2006 Jun 1;65(2):388-97.

[Kissick 2005] Kissick MW, Boswell SA, Jeraj R, Mackie TR. Confirmation, refinement, and extension of a study in intrafraction motion interplay with sliding jaw motion. Med Phys. 2005 Jul;32(7):2346-50.

[Koto 2004] Koto M, Miyamoto T, Yamamoto N, Nishimura H, Yamada S, Tsujii H, Local control and recurrence of stage I non-small cell lung cancer after carbon ion radiotherapy, *Radiotherapy and oncology* Vol. 71, No. 2. (2004), pp. 147-156

[Kraft 2007] Kraft G., Tumour therapy with heavy ions, Verein zur Förderung der Tumorthherapie mit schweren Ionen, 64291 Darmstadt, Germany, 2007.

[Kusano 2007] Y. Kusano, T. Kanai, Y. Kase, N. Matsufuji, M. Komori, N. Kanematsu, et al., Dose contributions from large angle scattered particles in therapeutic carbon beams, Medical Physics, 34 (1), 193-198 2007

- [**Ling 2000**] Ling CC, Humm J, Larson S, Amols H, Fuks Z, Leibel S, Koutcher JA. Towards multidimensional radiotherapy (MD-CRT): biological imaging and biological conformality. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000 Jun 1;47(3):551-60.
- [**Liu 2007**] Liu HH, Balter P, Tutt T, et al. Assessing respiration-induced tumor motion and internal target volume using four-dimensional computed tomography for radiotherapy of lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007 Jun 1;68(2):531-40.
- [**Lu 2007**] Lu HM, Brett R, Sharp G, Safai S, Jiang S, Flanz J, Kooy H. A respiratory-gated treatment system for proton therapy. *Med Phys.* 2007 Aug;34(8):3273-8.
- [**Lujan 1999**] Lujan AE, Larsen EW, Balter JM, Ten Haken RK. A method for incorporating organ motion due to breathing into 3D dose calculations. *Med Phys.* 1999 May;26(5):715-20.
- [**Lomax 2008**] Lomax AJ. Intensity modulated proton therapy and its sensitivity to treatment uncertainties 2: the potential effects of inter-fraction and inter-field motions. *Phys Med Biol.* 2008 Feb 21;53(4):1043-56.
- [**Mayahara 2007**] Mayahara H, Murakami M, Kagawa K, Kawaguchi A, Oda Y, Miyawaki D, Sasaki R, Sugimura K, Hishikawa Y. Acute morbidity of proton therapy for prostate cancer: the Hyogo Ion Beam Medical Center experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007 Oct 1;69(2):434-43.
- [**Minohara 2000**] Minohara S, Kanai T, Endo M, Noda K, Kanazawa M. Respiratory gated irradiation system for heavy-ion radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000 Jul 1;47(4):1097-103.
- [**Miyamoto 2003**] Miyamoto T, Yamamoto N, Nishimura H, Koto M, Tsujii H, Mizoe JE, Kamada T, Kato H, Yamada S, Morita S, Yoshikawa K, Kandatsu S, Fujisawa T. Carbon ion radiotherapy for stage I non-small cell lung cancer. *Radiother Oncol.* 2003 Feb;66(2):127-40.
- [**Mori 2007**] Mori S, Chen GT, Endo M. Effects of intrafractional motion on water equivalent pathlength in respiratory-gated heavy charged particle beam radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007 Sep 1;69(1):308-17.
- [**Mori 2008**] Mori S, Wolfgang J, Lu HM, Schneider R, Choi NC, Chen GT. Quantitative assessment of range fluctuations in charged particle lung irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008 Jan 1;70(1):253-61.
- [**Nihei 2005**] Nihei K, Ogino T, Ishikura S, Kawashima M, Nishimura H, Arahira S, Onozawa M. Phase II feasibility study of high-dose radiotherapy for prostate cancer using proton boost therapy: first clinical trial of proton beam therapy for prostate cancer in Japan. *Jpn J Clin Oncol.* 2005 Dec;35(12):745-52.
- [**Nihei 2006**] Nihei K, Ogino T, Ishikura S, Nishimura H. High-dose proton beam therapy for Stage I non-small-cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006 May 1;65(1):107-11.
- [**Nikoghosyan 2004**] Nikoghosyan A, Schulz-Ertner D, Didinger B, Jäkel O, Zuna I, Höss A, Wannemacher M, Debus J. Evaluation of therapeutic potential of heavy ion therapy for patients with locally advanced prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004 Jan 1;58(1):89-97.
- [**Nose 2009**] H. Nose, Y. Kase, N. Matsufuji, T. Kanai, Field size effect of radiation quality in carbon therapy using passive method, *Med. Phys.* 36 870-875 (2009)
- [**Phillips 1992**] Phillips MH, Pedroni E, Blattmann H, Boehringer T, Coray A, Scheib S. Effects of respiratory motion on dose uniformity with a charged particle scanning method. *Phys Med Biol.* 1992 Jan;37(1):223-34.
- [**Rietzel 2010**] Rietzel E, Bert C. Respiratory motion management in particle therapy. *Med Phys.* 2010 Feb;37(2):449-60.
- [**Tsuji 2005**] Tsuji H, Yanagi T, Ishikawa H, Kamada T, Mizoe JE, Kanai T, Morita S, Tsujii H; Working Group for Genitourinary Tumors. Hypofractionated radiotherapy with carbon ion beams for prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005 Nov 15;63(4):1153-60.
- [**ULICE 2011**] Union of Light-Ion Centres in Europe, Report D.JRA 2.1, Harmonisation of concepts and terms for volume and dose-volume parameters in photon, proton and carbon-ion therapy, Project co-funded by the European Commission within the FP7 (2007 – 2013), Grant agreement no.: 228436 February 2011
- [**van Herk 2000**] van Herk M, Remeijer P, Rasch C, Lebesque JV. The probability of correct target dosage: dose-population histograms for deriving treatment margins in radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000 Jul 1;47(4):1121-35
- [**Wambersie 2004a**] A.Wambersie, P.M.DeLuca, P.Andreo, J.H.Hendry, "Light" or "Heavy" Ions: a debate of terminology, *Radiotherapy and Oncology*, 73 (Suppl.2) ,iii, 2004

[Wambersie 2004b] A.Wambersie, J.Hendry, J.Gueulette, R.Gahbauer, R.Pötter, V.Grégoire, Radiobiological rationale and patient selection for high-LET radiation in cancer therapy, *Radiotherapy and Oncology*, 73(Suppl.2),1-14, 2004

[Wambersie 2009] A.Wambersie, P.Andreo, P.M.DeLuca, R.Gahbauer, J.H.Hendry, D.T.L.Jones, H.G.Menzel, G.Whitmore, Biological weighting of absorbed doses in particle-beam therapy: ICRU-IAEA recommendations on the isoeffect-dose concept, International Conference on Advances in Radiation Oncology, ICARO April 2009, IAEA, Vienna, CN-170, 324-325.

[Wambersie 2010] A.Wambersie, D.Jones, J.Gueulette, R.Gahbauer, P.M.DelUCA, What can we learn from the neutron clinical experience for improving ion-beam techniques and high-LET patient selection, *NEUDOS, Radiation Measurements*, 45, 1374-1380, 2010



Project co-funded by the European Commission within the FP7 (2007–2013)

Grant agreement no.: 228436

ULICE

Union of Light Centres in Europe

Project type: Combination of CP & CSA
Integrating Activities / e-Infrastructures / Preparatory phase

Start date of project: 1st September 2009 Duration: 48 months

D.[JRA 2.7] - Pattern of tumor relapse and “toxicogenesis” in Carbon Ion RT (CIRT)

Delivery date: (month 36) 12/08/31

WP2 – Concepts and terms for dose volume parameters and for outcome assessment in hadron-therapy integrating applied biology, medical physics and clinical medicine in ULICE

WP leader: Ulrike Mock, Jacques Balosso

Reporting period: 3rd

	Name	Partner	
Author(s):	G.Vogin, J.Balosso M.Schmid,A.Wambersie,	UCBL MUW	2012/08/31
Contributor(s):			
Pillar coordinator:	Richard Pötter	MUW	
Approved by TPB and CPO		signature	

Dissemination Level		
PU	Public	×
PP	Restricted to other programme participants (including the Commission Services)	
RE	Restricted to a group specified by the consortium (including the Commission Services)	
CO	Confidential, only for members of the consortium (including the Commission Services)	

TABLE OF CONTENTS

LIST OF ABBREVIATIONS AND DEFINITIONS	4
PUBLISHABLE SUMMARY	6
1. INTRODUCTION	6
2. EXCURSUS: EXPERIENCE FROM IGABT	7
3. IMPORTANT ASPECTS OF OUTCOME ASSESSMENT IN CIRT BASED ON THE EXAMPLE OF SKULL BASE CHORDOMAS	7
4. METHODOLOGY PROPOSED FOR ASSESSING OUTCOME AND PATTERNS OF RELAPSE IN CIRT AND LITERATURE REVIEW	12
4.1. APPROACH 1: Real vs. planned dose delivery ⇒ <i>Did the target volumes and OAR receive the proper planned dose during RT?</i>	12
4.1.1. 3D percent dose difference map (dose difference maximal intensity projection, <i>Siemens™</i>).	12
4.1.2. Dose guided RT (DGRT)	13
4.2. APPROACH 2: Visualize the relapse ⇒ <i>when and where did the relapse/harm take place?</i>	14
4.2.1. Multimodality imaging, a way to approach tumor metabolism and heterogeneity within a rather homogenous morphology	14
4.2.2. Multimodality imaging and subGTV delineation: contribution in different endpoints	14
4.2.3. Multimodality imaging and functional sub OAR delineation	15
4.2.4. SubOAR delineation: correlation with improved tolerance?	16
4.2.5. The question of timing	16
4.3. APPROACH 3: Correlate with a given dose level ⇒ <i>which part of the target volume/OAR is involved?</i>	16
4.3.1. The concept of in-field, marginal and out-of-field failure	16
4.3.2. Contribution of multimodal imaging	16
4.3.3. Tumor heterogeneity and dose painting	17
4.3.4. The same approach may be used to assess late (severe) toxicity	17
4.4. CIRT specificities	18
4.4.1. In vivo PET imaging	18
4.4.2. Tumor heterogeneities, dose painting and the RBE issue	18

4.5. Minimal dataset recommended	19
4.6. Summary:	19
5. CONCLUSION	20
REFERENCES	21
APPENDIX	26
<i>EXEMPLARY CRF FOR OUTCOME ASSESSMENT IN CIRT AGAINST SKULL BASE CHORDOMAS</i>	26

LIST OF ABBREVIATIONS AND DEFINITIONS

CT	Computed Tomography is a medical imaging technique using a large series of two-dimensional X-ray images.
CTV	Clinical Target Volume is a volume of tissue that contains a demonstrable GTV and/or subclinical malignant disease at a certain probability considered relevant for therapy.
D	Absorbed dose is a measure of the energy deposited per unit mass of medium by ionising radiation, and so has the unit Gy.
DIsoE	Isoeffective dose is the absorbed dose that delivered under the reference conditions would produce the same biological effect in a given system as the actual treatment, all other conditions being the same.
Dref	Dose of the reference radiation quality selected for the definition of the RBE.
DRR	Digitally reconstructed radiograph
Dtest	Dose of the test radiation quality used for the definition of the RBE.
DVH	Dose-Volume Histogram is a concept used in radiation treatment planning.
FDG	Fluorodeoxyglucose is a radiopharmaceutical used in PET imaging.
fMRI	functional Magnetic Resonance Imaging is a type of specialised MRI scan measuring the hemodynamic response (change in blood flow) related to neural activity.
GTV	Gross Tumour Volume is the gross demonstrable extent and location of a tumour.
Gy	Gray is the name of the special unit of absorbed dose of ionising radiation, i. e. the absorption of one joule of ionising radiation by one kilogram of matter.
ICD-O	International Classification of Diseases for Oncology is a domain specific extension of the International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems for tumour diseases. This classification is widely used by cancer registries.
ICRU	International Commission on Radiation Units and Measurements is a standardisation body set up in 1925 by the International Congress of Radiology.
IMRT	Intensity-Modulated Radiation Therapy is an advanced type of high-precision radiation therapy technique.
Interfraction	Occurring between treatment sessions
Intrafraction	Occurring within a treatment session
ITV	Internal Target Volume is defined as the CTV plus a margin which takes into account uncertainties in size and shape of the CTV and its position/movements within the patient.
LET	Linear Energy Transfer is a measure of the energy transferred to material as an ionising particle travels through it.
MRI	Magnetic Resonance Imaging is a medical imaging technique using a powerful magnetic field.
MRI-FLAIR	Magnetic Resonance Imaging FLuid Attenuated Inversion Recovery is a pulse sequence (inversion recovery technique that nulls fluids) used in MRI.

OAR	Organ At Risk or critical normal structures are tissues, which if irradiated could suffer significant morbidity, and thus might influence the treatment planning and/or the dose prescription.
PET	Positron Emission Tomography is a medical imaging technique using pairs of gamma rays emitted indirectly by a positron-emitting radionuclide.
PET-CT	Positron Emission Tomography and Computed Tomography is a medical imaging device which combines in a single gantry system both a PET and a CT.
PRV	Planning Organ at risk Volume is, in analogy with the PTV, a geometrical concept considering uncertainties and variations in the position of organs at risk during treatment.
PTV	Planning Target Volume is a geometrical concept introduced for treatment planning and evaluation. It is the recommended tool to shape dose distributions to ensure that the prescribed dose will actually be delivered to all parts of the CTV, with a clinically acceptable probability, despite geometrical uncertainties such as organ motion and set-up variations. It is used for dose prescription and reporting.
RBE	Relative Biological Effectiveness is defined as the ratio of a dose of a reference radiation quality to the dose of the test radiation quality required to cause the same biological level of effect, all other conditions being the same.
RVR	Remaining Volume at Risk is the volume that is within the imaged region of the patient, and outside all delineated OARs and CTVs.
SOPB	Spread-Out Bragg peak is an overlap of several pristine Bragg peaks at staggered depths.
SUV	Standardised Uptake Value is often used in PET imaging for (semi-)quantitative analysis of dynamic data. It is useful for a simple analysis of FDG images, e. g. to monitor the progress of disease during cancer therapy.
TNM	Classification of Malignant Tumours is a cancer staging system that describes the extent of cancer in a patient’s body. T describes the size of the tumour and whether it has invaded nearby tissue; N describes regional lymph nodes that are involved; M describes distant metastasis (spread of cancer from one body part to another).
TPS	Treatment Planning System used in radiation therapy for planning the doses in the tumour and the surrounding healthy tissue (critical organs).
TRiP	Treatment planning for Particles a treatment planning system for ion therapy developed at GSI and used at HIT, Germany.
TV	Treated Volume is the volume of tissue that receives at least the dose specified by the radiation oncologist in charge of the patient and considered as appropriate to achieve the goal of the treatment within the bounds of acceptable complications.
UICC	International Union Against Cancer is a non-governmental organisation dedicated exclusively to the global control of cancer.
VOI	Volume Of Interest is a generic term that can be used to refer to any volume that needs to be identified. The GTV, PTV, and OAR are examples of specifically-named VOIs.
WHO	World Health Organisation is a specialised agency of the United Nations that acts as a coordinating authority on international public health.
WIsOE	Weighing factor which takes into account the effects of all factors that could influence the outcome (mainly, dose per fraction, overall time, dose rate and radiation quality). Multiplication of weighing factor with absorbed dose results in the isoeffective dose.

PUBLISHABLE SUMMARY

Outcome assessment is crucial for understanding and improving current and upcoming treatment strategies. Outcome assessment in the field of hadron therapy will mainly imply analysis of local / regional relapses and treatment related side effects. Given the heterogeneous dose distribution delivered by proton or carbon ion beams, outcome assessment will be challenging and will make additional efforts in comparison to conventional photon beam radiotherapy necessary. Relevant aspects for outcome assessment in hadrontherapy include dose assessment and recalculation, dose-volume histogram analysis (based on standardized of target and organs at risk definitions), dose-effect analysis (by correlating dedicated dose parameters to specific events such as local recurrence) and multimodality imaging (morphological and topographical depiction of tumour and recurrence, visualisation of tumour / recurrence biology, visualisation of tumour response during therapy, visualisation of dose delivery). Finally an exemplary CRF is presented.

1. INTRODUCTION

The use of proton or carbon ions in radiation therapy (RT) will likely lead to highly individualized treatments. The outstanding physical characteristics of proton or carbon ion beams will allow for high dose delivery to the target volume (or even dose escalation within the target) while sparing the surrounding healthy tissues. This aspect may be especially advantageous in clinical situations with localized, bulky, not operable, radioresistant/hypoxic tumors with complex anatomical topography, where the target and the OAR are in direct proximity. Local/regional control is the priority. Such treatments will result therefore in highly heterogeneous dose profiles with areas of (high-) dose-peaks and areas of sharp dose fall offs. These considerable fluctuations of the dose distribution within the patient will be followed by varying biological effects at different sites. Moreover carbon ion beams deliver a higher equieffective dose (relative to the physical absorbed dose) in the spread-out Bragg peak area – that is supposed to encompass only the GTV and CTV(s). Additional challenges may occur due to topographical changes by tumour shrinkage, organ movement etc. In such cases dose prescription (and dose assessment by) to conventional dose points will hardly sufficiently reflect these complex procedures (WP2.5). Thus, one of the major challenges in proton and carbon ion RT will be how to analyse and compare relevant dose and volume parameters and their corresponding spatial dose distribution to correlate with both tumor- and OAR outcome.

A better understanding of tumour local/regional failure (LRF) patterns will help to evaluate the value of ion beam -therapy comprehensively in 3D and 4D.

Local treatment failure may occur in different conditions:

- planned underdosage of part of the CTV/PTV to protect OAR
- unexpected CTV/PTV underdosage due to organ motion, weight loss, tumour shrinkage...
unexpected CTV/PTV under dosage due to setup errors, delineation error, unidentified target volume...)
- global or partial CTV/PTV radioresistance (biological heterogeneity)
- inadequate radiobiological models (e.g., for RBE evaluation)

Radiobiological mechanisms that affect — or are suspected to affect — the outcome after RT may be classified as tumour burden, tumour cell proliferation and hypoxia. Specific radiotracers were developed to investigate those hallmarks of cancer using PET imaging.

On the other hand, toxicity related to the prescription has to be precisely analyzed to be correlated with dose deposition in regard with OAR topography. Given that it is extremely difficult to obtain pathological samples of human normal tissue after irradiation for histological and biological analysis and for longitudinal examination, it is important to establish in vivo functional and molecular imaging as a biomarker for early assessment and prediction of delayed or late organ dysfunction.

Dose and volume analysis will need comprehensive clinical research by linking dose-volume parameters to patient related events assessed by clinical investigations, modern morphological and functional imaging or

biological markers leading to dose-effect relationships. The predictive value and clinical relevance of dose and volume parameters will be in the centre of attention.

2. EXCURSUS: EXPERIENCE FROM IGABT

The scientific background of image-guided adaptive brachytherapy (IGABT) – a somehow comparable high precision and small volume treatment technique - may serve as a role model. In IGABT the radio-oncologist is confronted with similar challenges in terms of heterogeneity of the dose distribution and sharp dose fall off. First insights on dose-effect relationships were derived from connecting repetitive imaging, image-guided treatment planning, biology related adaptive target concepts and clinical outcome. By creating specific target volumes according to the potential tumour load and tumour response patterns (initial GTV at diagnosis, GTV at the start of brachytherapy, high-risk clinical target volume – HR CTV, intermediate-risk target volume) a significant dependence between certain – biologically weighted - dose values and their probability for achieving local tumour control could be demonstrated. It was shown that if a $D_{90} \geq 87$ Gy for the HR CTV is applied, a local tumour control rate greater than 95% is achievable [3, 4]. Further topographic and dosimetric analyses revealed different patterns of LRF by directly linking low dose regions to the subsequent areas of failure. Within a matched-pair analysis significant differences in various dose parameters, which allowed for assessment of the heterogeneous dose distribution within the target volume (“D100, D98, D90, D50, mean point dose – MPD”), were shown between patients with a local recurrence and patients in continuous complete remission.[5] Similarly, first dose-effect relations could be observed for the assessment of late toxicity. The dose to specific small volumes was shown to predict the onset of certain side effects (e.g. rectal bleeding) by correlating dose with clinical symptoms and endoscopic findings.[6] Dose effect analysis demonstrated a significant dependence between rectal and urinary side effects grade 2-4 and the D_2 cm³. The corresponding ED10 values were 78 Gy (rectum) and 101 Gy (bladder). Overall, actuarial incidence rates for G3/G4 side effects were 2% for rectum and 4% for bladder.

3. IMPORTANT ASPECTS OF OUTCOME ASSESSMENT IN CIRT BASED ON THE EXAMPLE OF SKULL BASE CHORDOMAS

An interesting example to raise hypothesis on pattern of tumor relapse and “toxicogenesis” in hadron-therapy are skull base chordomas. Skull base and cervical spine chordomas (SBCSC) are rare but locally aggressive and relatively radioresistant mesenchymal tumors surrounded by numerous OAR that constrain the therapeutic window.[7-10]

SBCSC are usually treated with a combination of radical surgery and particle therapy. A clear relationship between median (biologically weighted) delivered dose and local control probability was evidenced (Figure 1). Doses ranging between 25 and 60 Gy are purely symptomatic [11, 12]. Protontherapy is well suited due to the rapid fall off of the dose at the distal end of the Bragg peak and at its lateral edges – that may spare critical structures and permit a dose escalation on tumour volumes [13-15]. CIRT was first evaluated at NIRS with phase I-II studies [16]. A phase III study that assess the benefit of CIRT is ongoing at HIT (HIT-1) [17]. We investigated SBCSC due to their interesting pattern of relapse.

In-field LRF remains the most common type of failure. Marginal LRF arise adjacent to the original tumour volume but immediately outside the primary treatment target volume where a dose reduction is imposed by the proximity of organs at risk [18-21]. This concept will be clearly defined later. Maximum diameter, regional invasion, volume of the GTV, tumour dose and homogeneity, location of the tumour and age appeared as prognostic indicators of local control [15, 21].

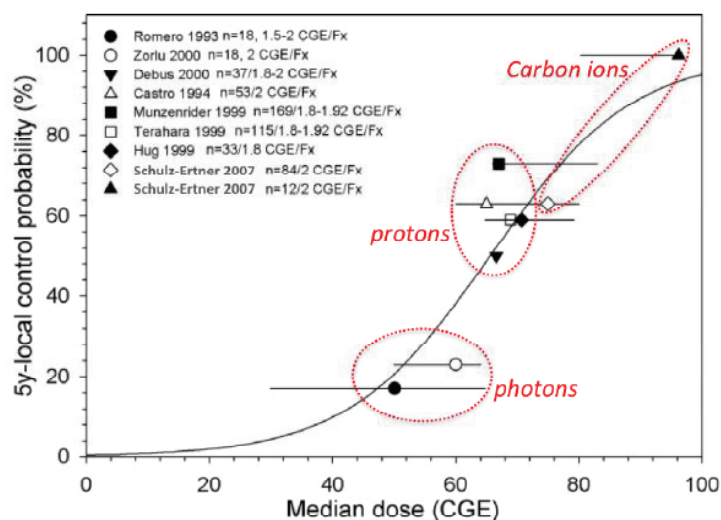


Figure 1: Local control probability related to dose (biologically weighted) [2]

On the other hand atypical recurrences – i.e. out-of-irradiation field such as surgical pathway, nodal, intradural – are however reported by numerous oncologists [22]. Their analysis may help the physician to better understand the definition of the target volumes and their coverage with the appropriate dose level.

A retrospective study was performed on 371 patients treated at the Institut Curie-Orsay Protontherapy Center between 1995 and 2009. With a median follow-up of 27 months (13-96), 13 patients developed an atypical LRF (G.Vogin et al., submitted). Table 1 and Figure 2 summarize the initial presentation and treatment on the one hand and the relapse modality and its management on the other hand.

patient	age at diagnosis	sex	initial tumoral site	biopsy ?	biopsy pathway	surgical pathway(s)	radiation dose (Gy volume RBE)	RTV volume (cc)	recurrence site	relapse after surgery (months)	retreatment dose (Gy RBE)	relapse outcome	timepoint after relapse (months)	note
1	56	M	seller	N	N/A	transnasal, left temporal, left latero cervical	74	46.6	pteron and L temporal muscle	26	64.8	alive	8	/
2	25	F	seller, L petrosal, L sphenococcipital, cervical, nasopharyngeal, L paranasopharyngeal	N	N/A	L anslem lateral, L postern lateral, transnasal	70	54.6	sub cutaneous (scalp and neck)	17	N/A	alive	5	progression
3	45	M	seller, petrosal, prevertebral and retropharyngeal	Y	transnasal	transpalatine, transmaxillary, L temporo-cervical, R infotemporal	71	0	nasal septum	96	59.4	alive	30	CR
4	67	M	cervical, prevertebral, vertebral canal, modulla oblongata	Y	transoral	posterior	67	43.8	seller	18	70.2	dead	11	/
5	56	M	cervical	Y	L cervical and transoral	bi cervical	71	638.0	cervical lymphadenopathies	14	54	dead	84	/
6	50	M	seller, nasopharyngeal, prevertebral, cervical, paranasopharyngeal, brainstem	N	N/A	R transcondylar, L sub temporal, R retro mastoid, transsphenoidal	70	0	sub cutaneous (scalp and retroauricular)	43	N/A	alive	14	progression
7	61	F	seller, nasopharyngeal, paranasopharyngeal	N	N/A	anterior, L frontotemporal, transoral, transrhinospinal	71	63.8	C5, C6, prevertebral space	27	54	alive	48	progression (imatib)
8	12	F	seller, paranasal, suprasellar	N	N/A	rhinoscopal, R frontoparietal	70.2	66.6	pharynx, nasa some	13	N/A	dead	29	/
9	44	F	seller, paranasal, suprasellar	Y	transnasal	rhinoscopal	71	28.6	pharynx	57	N/A	alive	14	CR
10	53	M	seller, L petrosal, L sphenococcipital, nasopharyngeal, paranasopharyngeal, cervical, prevertebral, pharyngeal mucosal spaces, R cervical lymphadenopathies	Y	R latero-cervical	R anterolateral, bi posterolateral	67	22.5	R pre vertebral, sub cutaneous (R forearm)	78	60 (photons, bifractionated)	alive	55	CR
11	26	F	sphenococcipital, petrosal, paranasopharyngeal	N	N/A	R remsigmoid cervical	71	74.8	C3, C6, T1 with spinal cord compression	21	N/A	dead	5	/
12	49	F	seller, nasopharyngeal, prevertebral, cervical, R latero-cervical	Y	transoral	transoral, bilateral	68	96.3	prevertebral lymphadenopathies, lura metastosis	27	N/A	alive	16	progression
13	58	F	seller	N	N/A	R trans latero nasal, fronto-temporo-zygomatic	67	65.3	ethmoid	78	59.4	alive	24	CR

Table 1: Description and management of the 13 patients who experienced atypical relapse.

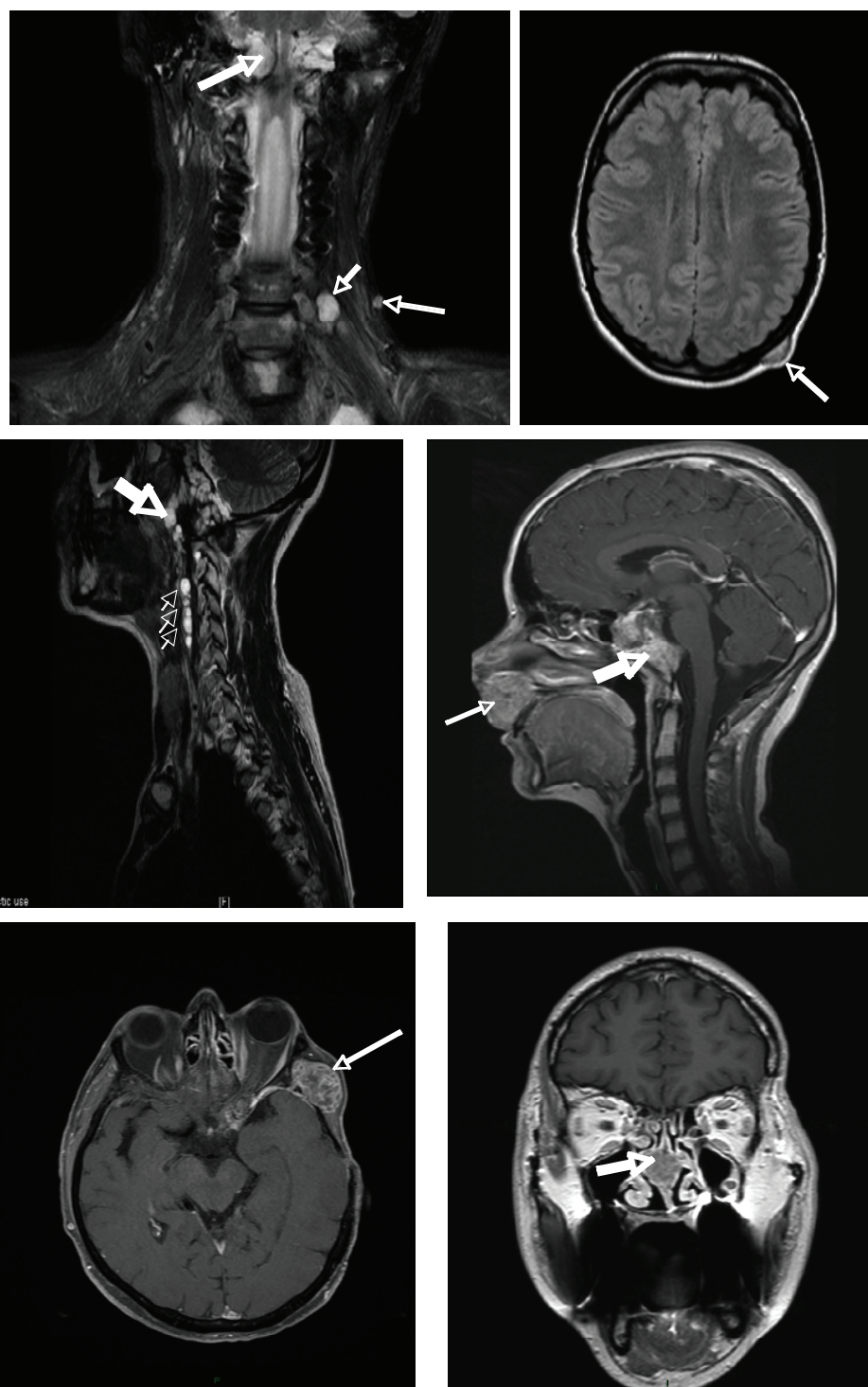


Figure 2: Illustration of the atypical relapses encountered in our series. **Top Left:** Patient #2: latero vertebral (short thin arrow) and sub cutaneous left cervical relapses (long thin arrows) under the stable primary cervical chordoma (large arrow; coronal T2 weighted fat saturated MR image). **Top Right:** Patient #2: synchronous sub cutaneous metastasis of the skull; (axial FLAIR MR Image). **Center Left:** Patient #12. Left panel: prevertebral drop cells (thin arrows) issuing from the primary cervico clival location (large arrow), sagittal T2 weighted MR image. **Center Right:** Patient #8: Secondary tumour of the philtrum (thin arrow) on the surgical pathway, 13 months after a rhino septal approach for a clival chordoma (large arrow); (sagittal gadolinium enhanced T1 weighted MR image). **Bottom Left:** Patient #1: temporal bony relapse (thin arrow) on the surgical pathway, 26 months after the first surgery, (Axial gadolinium enhanced fat saturated T1 weighted MR image). **Bottom Right:** Patient #3: Naso septal relapse 96 months after the surgery. The tumour is located on the biopsy pathway (large arrow) (coronal gadolinium enhanced T1 weighted MR image)

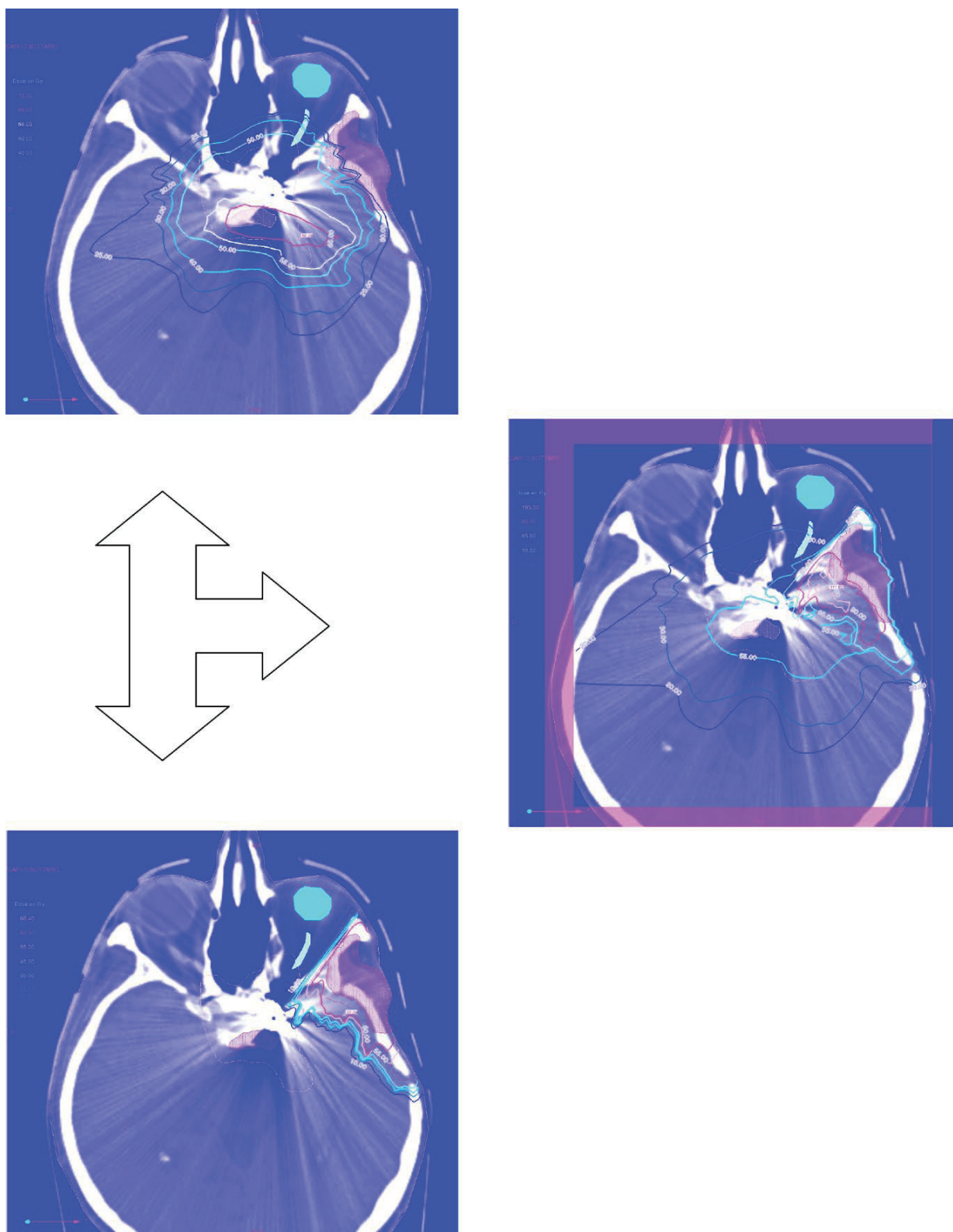


Figure 3: Second RT course in patient #1, exclusively reirradiated by one proton beam. Isogray™ (Dosisoft) treatment planning system. **Top:** November 2008: 74.0 Gy (RBE) delivered on the HR-PTV1 (pink shaded area) for a clival chordoma. **Bottom:** January 2010: 64.8 Gy (RBE) delivered on the HR-PTV2 (red shaded area) for the pterionic recurrence (protons only). **Center:** Cumulative planning. Note that the left optic nerve received less than 55.0 Gy (RBE) .

Matched CT scan and MR imaging were used to delineate target volumes (detailed elsewhere [23]) Biopsy or surgical pathways were usually not entirely included into the CTV.

Three dose-regimens were successively used. From 1994 to 2000, 64 patients were enrolled to receive 67 Gy (RBE) (45 Gy by photons and 22 Gy (RBE) by protons) [21] and from 2001 to 2005, 198 patients received 71 Gy (RBE) (45 Gy by photons and 26 Gy (RBE) by protons) [24]. Since 2006 dose may be escalated up to 74.0 Gy (RBE) depending on the homogeneity of the dose covering the high-risk volume and the OAR constraints (n=107) [23]. For protons a generic RBE of 1.1 was applied as recommended by the ICRU-IAEA [ICRU 2007].

Consideration might be given in regard of the inclusion of operative routes in the postoperative irradiation fields; e.g. for selected patients with adverse prognostic factors after multiple surgeries in a long time interval [25]. However in such situations, a substantial volume of healthy tissues will be irradiated and may suffer from adverse reactions - that must be balanced against the scarcity of these relapses.

Protons are generally used as a re-irradiation procedure due to the sharper ballistics they offer.

Carbon ion RT is an option thanks to a biological enhanced efficiency. A reirradiation study with CIRT is reported by S.Combs et al. Local tumour control after re-irradiation was 92% at 24 months and 64% at 36 months [26].

The same classification of tumour relapse could be applied to tumours treated with CIRT using an appropriate CRF (appendix)

4. METHODOLOGY PROPOSED FOR ASSESSING OUTCOME AND PATTERNS OF RELAPSE IN CIRT AND LITERATURE REVIEW

Locoregional failure (LRF) remains the predominant pattern of failure in tumours treated with high-precision RT, and especially particle RT, with the majority occurring "in-field" within the high-dose volume.[27] Marginal failures can occur, particularly in the vicinity of the spared OAR. The therapeutic index of high-precision conformal RT is largely dependent on adequate selection and delineation of target volumes and organs at risk. In that aim multimodality imaging fusion with planning CT offers a gain in accuracy. The practical use of functional/molecular imaging in RT optimization must take into cautious consideration several factors whose influences are still not clearly quantified or well understood including (1) patient positioning differences between the planning computed tomography and functional/molecular imaging sessions, (2) image reconstruction parameters and techniques, (3) image registration, (4) target/normal organ functional segmentation, (5) the relationship governing the dose escalation/sparing warranted by the functional/molecular image intensity map, and (6) RT-induced changes in the image intensity map over the course of treatment.

Here we propose a method based on 3 state-of-art photon RT approaches and multimodality imaging to assess the pattern of relapse/severe toxicity applicable to CIRT.

4.1. APPROACH 1: Real vs. planned dose delivery ⇒ *Did the target volumes and OAR receive the proper planned dose during RT?*

During primary (CI)RT course: treatment-day dose evaluation may be performed to assess how the planned dose differed from the really delivered dose. Anatomical changes (e.g. tumour shrinkage, radiation-induced oedema, or weight loss) may indeed impact dose coverage of the target.

4.1.1. 3D percent dose difference map (dose difference maximal intensity projection, Siemens™).

Megavoltage cone-beam CT images acquired on the treatment day are used for generating the dose difference index. Each index is represented by different colours for underdose, acceptable, and overdose regions. A maximal intensity projection (MIP) algorithm is developed to compress all the information of an arbitrary 3D dose difference index into a 2D DD-MIP image. In such an algorithm, a distance transformation is generated based on the planning CT. Then, two new volumes representing the overdose and underdose regions of the dose difference index are encoded with the distance transformation map. The distance-encoded

indices of each volume are normalized using the skin distance obtained on the planning CT. After that, two MIPs are generated based on the underdose and overdose volumes with green-to-blue and green-to-red lookup tables, respectively. Finally, the two MIPs are merged with an appropriate transparency level and rendered in planning CT images.

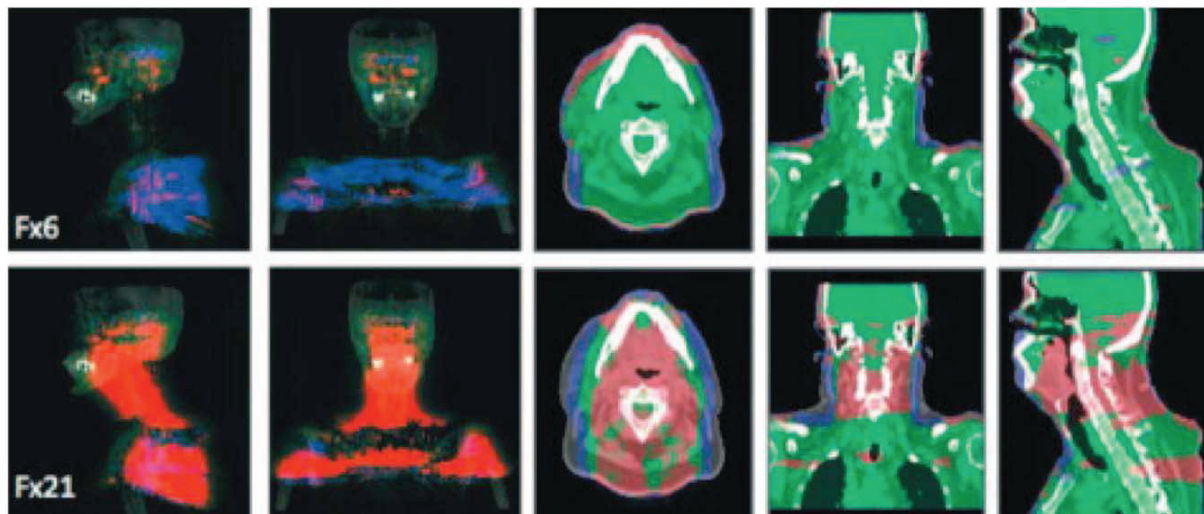


Figure 4: The MIPs (left) and PDoseDiff maps (right) in the 6th and 21st fractions. There are obvious dose differences (red areas) in the Fx21.[28]

4.1.2. Dose guided RT (DGRT)

Daily or weekly three-dimensional images of patients in treatment position are acquired for image-guided radiation therapy. These images can be used for calculating the actual dose delivered to the patient during treatment after corrections (cupping, missing data artefacts), calibration, completion, recontouring, and dose recalculation).

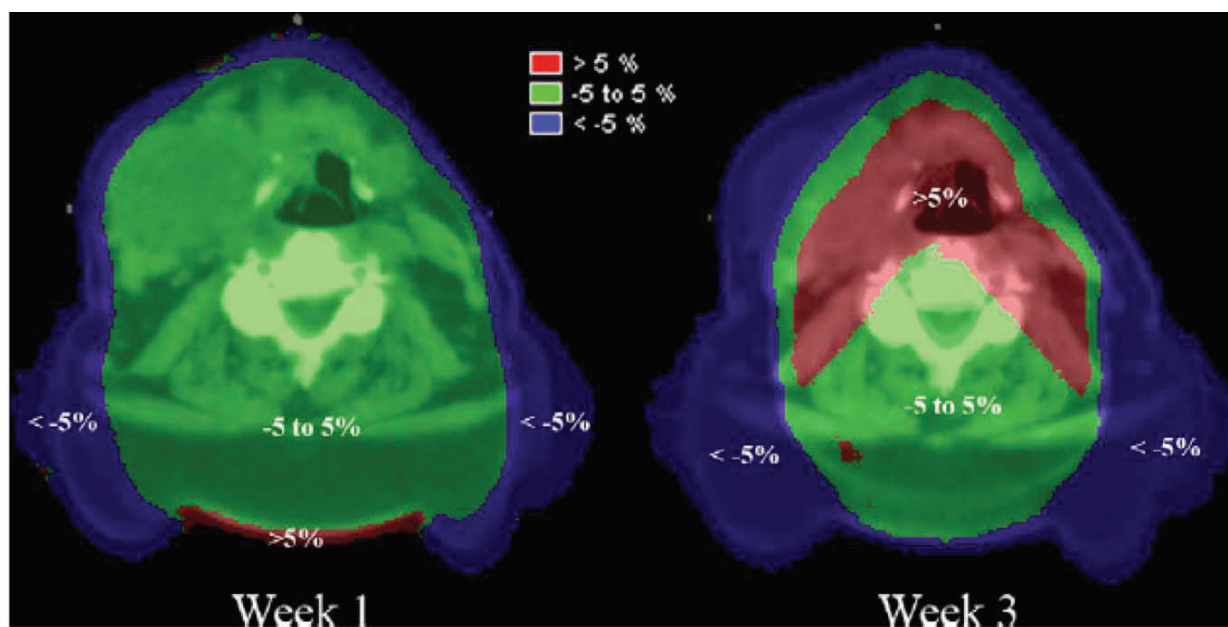


Figure 5: Comparison of the dose different maps on the first week of treatment and the third week overlaid on the planning kVCT image. The colours are windowed to show PDDiffs of greater than 5% (red), less than -5% (blue), and within 5% (green); [29]

4.2. APPROACH 2: Visualize the relapse ⇒ *when and where did the relapse/harm take place?*

4.2.1. Multimodality imaging, a way to approach tumour metabolism and heterogeneity within a rather homogenous morphology

In RT, staging, treatment planning, monitoring and evaluation of response are traditionally based on computed tomography (CT) and magnetic resonance imaging (MRI). These radiological investigations have the significant advantage to show the anatomy with a high resolution, being also called anatomical imaging. In recent years, so called biological imaging methods which visualize metabolic pathways have been developed. These methods offer complementary imaging of various aspects of tumour biology. To date, the most prominent biological imaging system in use is functional MRI and positron emission tomography (PET), whose diagnostic properties have clinically been evaluated for years.

Subsets of tumour cells within the GTV may be more resistant to RT due to adverse biological factors [30]. PET brings in the crucial functional and molecular information, which enable the direct evaluation of tumour metabolism, cell proliferation, apoptosis, hypoxia and angiogenesis according to the PET tracer used [31]. Complementarily, MRI allows the determination of parameters distinctive of tumour tissue as hydrogen-ion concentration (pH) and vessel characteristics as angiographic structure, hemodynamic, vessel permeability, and vessels size. {Ostergaard, 1996 #128; Tropres, 2004 #129}

The Standardized Uptake Value (SUV) is often used in PET imaging for (semi-)quantitative analysis, calculated either pixel-wise or over a region of interest for each image of a dynamic series according to time, ratio of tissue radioactivity concentration, injected dose and body weight.

The term “biological target volume” (BTV) is aimed at defining biologically interesting sub-volumes (field in field) of the tumour like a target within the GTV, which could be irradiated with a higher dose [32]. The goal would typically be identification of the entire tumour with an optimal match between the size of the BTV with the true tumour size and metabolism at histology.

However PET images must not be used solely to delineate volumes due to their low spatial resolution, enhanced by organ motion, and high-noise characteristics [33].

PET gives quantitative information on relative tracer uptake – that is usually manually processed, thus subject to high variability between operators. A single SUV cut-off is unlikely to be adequate to define tumour edges due to inter individual normal SUV variation based on patient body habitus. “Intelligent contouring” was developed by one group [34].

Although available radiotracers have exquisite specificity for a biological process, non specific uptake has been seen with virtually all PET tracers (post RT tumour infiltration by macrophages, active infections, inflammation, recovery...)

4.2.2. Multimodality imaging and subGTV delineation: contribution in different endpoints

The critical influence of tumour volume on treatment outcome in several cancer locations is well established. Early response assessment during the treatment course, while adjustments in therapy can still be made, has been a challenge because of the difficulty in accurately measuring tumour volume, irregular shapes and non-linear tumour shrinkage during treatment.

Tumour response assessment with multimodality imaging can be appreciated at different time points.

- *Multimodality imaging prior RT: contribution in generating initial RT plan*

PET helps the oncologist to guide volume delineation based on biological processes and dose prescription. 18F- fluorodeoxyglucose (FDG) PET imaging is used in a wide variety of malignant tumours with sensitivities, specificities and accuracy often in the high 90th percentile range. Pre-RT FDG-PET uptake may be a surrogate for proliferation or hypoxia in head and neck patients [35]. GTV definition with PET/CT fusion has been clinically implemented after state-of-art prospective studies mainly in NSCLC, H&N, GBM and Hodgkin lymphomas [36, 37][38].

An attempt to associate imaging findings and pathology was recently performed in 34 patients with NSCLC underwent CT and FDG-PET before lobectomy. Specimens were examined microscopically for microscopic extension. The gross tumour volume (GTV) on CT and PET (GTV_{CT} and GTV_{PET}, respectively) was compared with the GTV and the CTV at pathologic examination. Both CT and FDG-PET accurately visualized the CTV(path) in low-risk tumours but underestimate it in high-risk tumours [39].

Other radiotracers are assessed in glioblastoma delineation such as ¹¹C-methionine and O-(2-[¹⁸F]fluoroethyl)-l-tyrosine (FET); their relative uptake is correlated with tumour control [40, 41].

- *Multimodality imaging during RT: contribution to modify the RT course*

Tumour regression or metabolic modifications under RT have been correlated with local response in several situations. MRI-based 4-dimensional volumetric tumour regression pattern during ongoing cervical RT was recently found to correlate with RT responsiveness. Serial 3-dimensional volumetric MRIS were performed before RT, at 20 Gy, at 50 Gy and at 1-2 months post RT in 115 patients with a mean follow up of 5.3 years. The temporal threshold criteria of proportional tumour at 45–50 Gy and 1–2 months post-RT independently correlate with local control and survival and can lead to treatment adaptation [42].

Changes in the Brownian motion of water within tumour tissue as quantified by using diffusion MRI could also be used as a biomarker for early prediction of treatment response in brain tumours [43].

- *Multimodality imaging before vs. after RT: predictive imaging biomarker*

FDG-PET in Hodgkin lymphoma is implemented in daily practice to stratify treatment intensity [37]. The relative uptake measured after initial chemotherapy can guide the need for additional RT.

The relative tracer uptake assessed prior and after RT may correlate with local control.

Ten patients with LRF of non-small cell lung cancer (NSCLC) underwent FDG-PET/CT before, during, and in the 4-12 months following curative chemoRT using a combined PET/CT scanner. PET-revealed partial in eight patients and complete metabolic response in two patients during RT. Six to nine months after RT, LRF was diagnosed in all patients with both methods. Tumour recurrences were localized mostly in the most active subvolumes of pre-therapeutically metabolic regions of the primary tumour [44].

PET responses were prospectively assessed among 88 patients after concurrent platinum-based radical chemo/RT for NSCLC. Metabolic imaging was acquired prior RT and at a median of 70 days after RT. Complete metabolic response warranted a better LC (p = 0.009) [45].

4.2.3. Multimodality imaging and functional sub OAR delineation

RT-induced injury can be apprehended by anatomical (structural) changes in affected organs or functional, molecular and cellular processes. RT first commonly causes changes that can be detected by planar X-ray or CT imaging. For example, in patients treated for lung or breast cancer, approximately 50–100% and 0–63%, respectively, have radiologic evidence of lung damage via chest X-ray or CT.[46]

These changes in imaging, however, do not necessarily correlate well with symptomatic injury. On the other hand, the potential advantage of functional and molecular imaging over anatomic imaging is that it may be more physiologically and clinically important, and may better reflect underlying pathophysiologic processes. Data for several organ systems such as lung [47], heart [48], liver [49], brain [50] and parotid [51] have already revealed correlations of radiation dose with changes measurable by a variety of functional imaging modalities.

It appears possible to delineate sub compartments of OAR using multimodality imaging raising the possibility to spare not only full-OAR integrity but also sub-OAR function. RT of cephalic tumours is limited by the differential sensitivity of CNS normal structures. In CNS, specific functions are ensured by sub compartments with specific molecular and cellular architecture [52]. Fiber tract trajectories in coherently organized brain white matter pathways can be computed from in vivo diffusion tensor magnetic resonance imaging giving insight on brain fibers pathways [53].

4.2.4. SubOAR delineation: correlation with improved tolerance?

Multimodality imaging first helps the radiation oncologist to better delineate the target volumes and thus indirectly spare more healthy tissues leading to a better tolerance. In pharyngo-laryngeal squamous cell carcinoma, target volumes delineation based on pre-treatment FDG-PET spares significantly more irradiated volume compared to pre-treatment CT-based delineation. Pre-treatment MRI-based GTV delineation offers moreover a supplemental reduction in the irradiated volumes. However, automatic delineation of FDG-PET GTV could not be performed during RT due to peri-tumoral inflammation.[54]

Multimodality imaging can be directly used to predict RT-induced toxicity. A relationship between FDG uptake in pulmonary tissue after radical RT and the presence and severity of radiation pneumonitis was recently evidenced in NSCLC. (18)F-FDG-PET was performed at a median of 70 days after completion of RT in 88 patients who received 60 Gy in 30 fractions + platinum-based chemotherapy. There was a significant association between the worst RTOG pneumonitis grade occurring at any time after RT and the PET radiotoxicity grade (one-sided $p = 0.033$) [55].

Single photon emission computed tomography (SPECT) provides a map of the spatial distribution of lung perfusion and can be used to divert dose away from higher-functioning lung, potentially reducing lung toxicity in thoracic irradiation. In 5 patients treated with IMRT on thoracic tumours, healthy lung was segmented into four regions on the basis of SPECT intensity in the SPECT plan. During treatment optimization, dose was sequentially allowed to the target via regions of increasing SPECT intensity. This process results in reduction of dose to functional lung, reflected in the dose-function histogram (DFH). In all patients, DFHs of the two highest-functioning SPECT regions were reduced, whereas DFHs of the two lower-functioning regions were increased [56].

4.2.5. The question of timing

Optimal planning of imaging follow-up is debatable and depends on tumour site and aggressiveness. We must weigh the risk of not detecting early recurrence accessible to a safe and curative local treatment against the risk of excessive repetition of invasive irradiating and expensive investigations. Thoughts were given by ESTRO in NSCLC [57].

A close collaboration with radiologists and nuclear physicians is highly recommended

4.3. APPROACH 3: Correlate with a given dose level \Rightarrow *which part of the target volume/OAR is involved?*

4.3.1. The concept of in-field, marginal and out-of-field failure

Prospective series have demonstrated patterns of failure after RT in H&N, NSCLC, GBM [27, 58, 59]. Imaging that documented failure after RT were usually fused to the original treatment plans for recontour and dosimetry analysis in the most recent studies. The aim is to link low dose regions to the subsequent areas of failure. The method of characterizing failures as in-field, marginal, or out-of-field was described elsewhere [60].

Briefly a relapse target volume (RTV) was identified on the post treatment CT, PET/CT, or MRI. RTV was then mapped to the planning CT scan to determine its isodose line (IDL) coverage. “In-field” failures were defined as having a $RTV \geq 95\%$ within the 95% IDL. “Marginal” failures had a $RTV 20-95\%$ within the 95% IDL. “Out-of-field” failures had a $RTV < 20\%$ inside the 95% IDL.

In case of in field or marginal failure the dose variation within the volume of interest compared to initial planning can be performed using the cumulative dose-corrected CT thereafter calculated.

Precise analysis of treatment failure can lead to novel recommendations on CTVs delineation as it has been done in rectal cancer.[61]

4.3.2. Contribution of multimodal imaging

The BTV concept should also be helpful in assessing the biological response of tumour to RT particularly interesting in locating a LRF according to pre-RT GTV and BTV. Inadequate BTV coverage is supposed to be associated with increased risk of LRF.

The relapse GTV/BTV can be setup on the planning CT. Pre-treatment and failure imaging scans can be registered to determine if the exact anatomical site of LRF coincides with the pre-treatment PET in defined tumour sites. In a recent study performed in H&N, pre-treatment and failure imaging scans were registered to determine if the exact anatomical site of LRF coincides with the pre-treatment PET defined GTV. All except one LRF occurred in the pre-treatment PET-BTV [62]. The same methods was performed in high-grade glioma based on ^{18}F -FET [63] and ^{11}C -methionine [40] PET planning prior and after chemo- and RT. Although most of LRF occurred in-field (within PTV), the degree of GTV and BTV mismatch correlated with local outcome was significant only in the second study.

4.3.3. Tumour heterogeneity and dose painting

Theragnostic imaging for radiation oncology is the use of molecular and functional imaging to prescribe the distribution of RT in four dimensions — the three dimensions of space plus time — of RT alone or combined with other treatment modalities in an individual patient. It aims to map the distribution of a tumour, tissue, or functional feature, and to provide information about the clinical response of tumours or healthy tissues to RT. Dose-painting was the term coined to visualize tumour sub volumes (i.e. BTV) with a potential resistance problem and to paint some additional dose onto that volume [32]. This notion was applied in a study by Chao *et al.* who identified regions with pronounced retention of ^{60}Cu -ATSM on a PET scan of a patient with H&N squamous-cell carcinoma [64].

In a planning study, they showed that 80 Gy could be delivered in 35 fractions to the hypoxic compartment of the GTV, with 70 Gy in 35 fractions delivered to the rest of the GTV. By use of standard bioeffect modelling to adjust for the slightly higher dose per fraction in the hypoxic target volume the EQD2 to this volume is about 82 Gy. The researchers used DVH to show that this dose distribution could be planned and delivered by means of inverse planned IMRT.

Dose-painting by numbers is a strategy by which the dose distribution delivered by inverse planned IMRT is prescribed in four dimensions. Painting by numbers introduces gradients of biological function or three-dimensional distributions of the density of radioresistant cellular phenotypes vs. the binary information with lower resolution given by PET (up taken voxels are either inside or outside the BTV) [65].

A hugely challenging, topic of research is to establish the prescription function that is the mathematical link between a specific value of an imaging variable and the optimum clinical dose to be prescribed to the corresponding voxel.

4.3.4. The same approach may be used to assess late (severe) toxicity

Except in the lung, radiation harm is hardly viewable on CT imaging. Multimodality imaging in parenchyma and endoscopy in cavities are prerequisites to precisely graduate toxicity and recontour the wound on the planning CT. Correlations between wound location and measures derived from treatment planning have to be evidenced in order to link high dose region(s) to the subsequent areas of morbidity as it was performed in the previously reported brachytherapy experience [6].

Using data from the RT01 prostate RT trial, the dose to the rectal wall was projected on a two-dimensional map. In order to characterize the dose distribution, its centre of mass, longitudinal and lateral extent, and eccentricity were calculated at different dose levels. Furthermore, the dose-surface histogram (DSH) was determined. Rectal bleeding was most strongly correlated with the lateral extent of the dose distribution. For loose stools, the strongest correlations were found for longitudinal extent; proctitis was most strongly correlated with DSH [66].

4.4. CIRT specificities

4.4.1. In vivo PET imaging

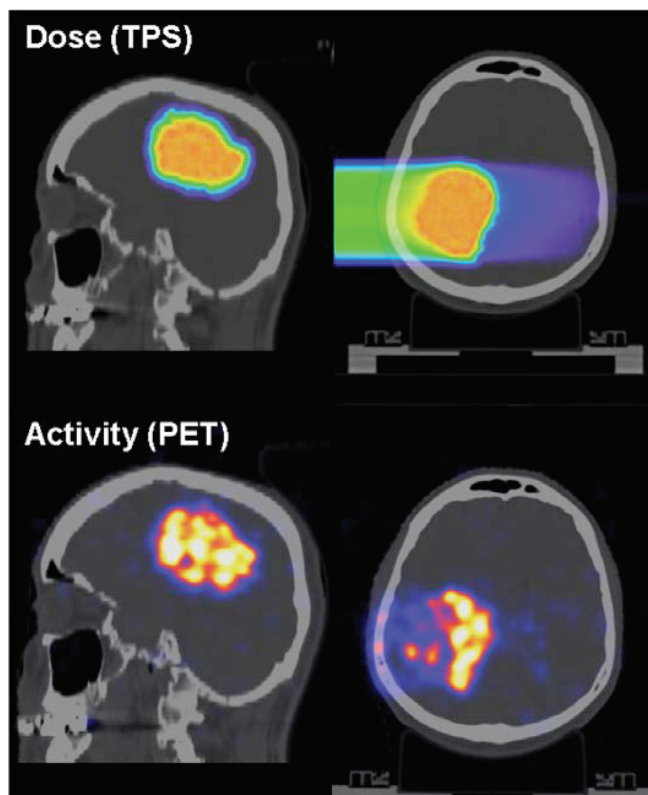


Figure 6: Patient undergoing a PET/CT measurement after scanned CIRT at HIT. The patient was treated for a primary brain tumour with a carbon ion boost. The top panel depicts the dose planned by the commercial TPS overlaid onto the planning CT in axial and sagittal views. The bottom panel depicts the PET image acquired ca. 8 minutes after irradiation and overlaid onto the control CT data, merged and visualized approximately in the same views as the top row.[1]

In vivo PET imaging uses the beta emitting properties of carbon ion fragments. ^{10}C and ^{11}C isotopes stop at the same location as the native beam and annihilate. As beta emitters, they generate two synchronous gamma rays in opposite directions that may be detected with a dedicated in situ PET camera (short lifespan of the fragments). By correlating the measured activity with the planned treatment and the actual patient anatomy as given by a computed tomogram, it is possible to infer valuable information on the actual dose delivery. The accuracy may reach up to 2 mm without overexposure. PET-based verification might be beneficial for patients having metallic implants, where known shortcomings of the treatment planning algorithms in combination with artefacts of the CT-based patient model are of major dosimetric concern in ion beam therapy [67]. Such monitoring will be implemented at HIT during a pilot study on 240 patients who suffer from tumours of the brain, skull base, head and neck region, upper gastrointestinal tract including the liver, lower gastrointestinal tract, prostate and pelvic region: the MIRANDA study [1].

4.4.2. Tumour heterogeneities, dose painting and the RBE issue

CIRT is aimed to treat localized, bulky, not operable, radioresistant/hypoxic tumours with complex anatomical topography, where the target and the OAR are in direct proximity. Local/regional control is the priority. There is an increased heterogeneity in large tumours with the presence of cells of increased radioresistance, hypoxic state, and proliferation ability. CIRT ensures a better dose distribution and target coverage is feasible due to the Bragg peak and a reduced penumbra. Furthermore, critical structures surrounding the tumour can be completely spared reducing the risk of both acute and late normal tissue toxicities and increasing patient quality of life [68].

CIRT and especially active scanning delivery is able to irradiate a given target volume with a voluntarily heterogeneous dose profile guided by tumour/OAR metabolism and thereby boost the dose to radioresistant subvolumes based on non-invasive functional imaging (dose and LET painting) [69].

There is an initial increase in the relative biological effectiveness (RBE) with the LET. Radiation response to high-LET -compared to low LET- radiation is less influenced by hypoxia, position in the cell cycle and DNA repair capacity as observed in such radioresistant subvolumes [70, 71].

However CIRT precision may decrease due to Bragg peak degradation as a result of heterogeneities in interposed tissues [72].

On the other hand CIRT delivery is likely to generate unexpected heterogeneities especially again in spot scanning due to the interplay effect (cf. JRA-WP2.5) [73]. This occurs as organ movement has to be synchronised with the scanning, increasing the risk of a geographical miss of the tumour that may be a particular issue for health tissues due to the increased RBE of the particles. Additional parameters may affect the range and the dose delivered to the interest voxels: tumour shrinkage, weight loss... Position error was found to be time dependent and this was amplified in the secondary scanning direction causing more dose heterogeneity [74].

4.5. Minimal data set recommended

To adapt the previous methodology to relapse studies in CIRT, the following dataset has to be collected. The initial morphologic imaging that gives insights in GTV volume, morphologic heterogeneity and anatomical relation. In addition to CT, MRI may be useful in various tumour sites such as pelvic, cephalic and limb tumours. The initial PET imaging gives additional data about the biological heterogeneity leading on the delineation of the BTV in non operated tumors. It is the responsibility of the radiation-oncologist in charge to combine the information provided by a careful clinical examination and the different diagnostic approaches (e.g., multimodality imaging) and as a result to delineate the CTVs, PTVs, and OAR. Treatment planning system then may merge these data, and optimizes the RT course. On the other hand the applied RBE values and resulting equieffect dose distributions depend on the selection of the radiobiological models and the numerical values of the included parameters. However we recommend to preserve the physical dose map. Periodic control imaging (kV, MV, CBCT, in vivo PET) have to be stored to evaluate the real-time anatomy modification and related dose delivery and identify deviations during RT. They permit an adaptive RT delivery. Evaluation imaging whatever their nature and timing will visualize treatment failure and toxicity during the follow-up. They may be merged with the initial CT planning and support relapse contouring and dose recalculation.

4.6. Summary:

	Aim	Tool(s)
APPROACH 1	Dose recalculation ⇒ <i>Did the target volumes or OAR receive the proper planned dose during RT?</i>	3D percent dose difference map with regular IGRT images[29], in vivo PET[75], back to physical dose map
APPROACH 2	Relapse kinetics ⇒ <i>When and where did the relapse/toxicity take place?</i>	Periodic multimodal imaging (x months)
APPROACH 3	Dose/volume correlation ⇒ <i>Which part of the target volume/OAR is involved?</i>	Fusion, corrected DVH, recontouring, dose recalculation

5. CONCLUSION

3D Dose–outcome relations could be developed based on long-term patient follow-up studies such as a retrospective matched pair analysis or within a *prospective study*.

Matching criteria are dependent on the investigated tumour site but may be: age, tumour location, histology, maximum diameter, volume of the GTV, dose.

REFERENCES

- [1] Combs SE, Bauer J, Unholtz D, Kurz C, Welzel T, Habermehl D, et al. Monitoring of patients treated with particle therapy using positron-emission-tomography (PET): the MIRANDA study. *BMC Cancer*.12:133.
- [2] Schulz-Ertner D, Karger CP, Feuerhake A, Nikoghosyan A, Combs SE, Jakel O, et al. Effectiveness of carbon ion radiotherapy in the treatment of skull-base chordomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007 Jun 1;68(2):449-57.
- [3] Dimopoulos JC, Lang S, Kirisits C, Fidarova EF, Berger D, Georg P, et al. Dose-volume histogram parameters and local tumor control in magnetic resonance image-guided cervical cancer brachytherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009 Sep 1;75(1):56-63.
- [4] Dimopoulos JC, Potter R, Lang S, Fidarova E, Georg P, Dorr W, et al. Dose-effect relationship for local control of cervical cancer by magnetic resonance image-guided brachytherapy. *Radiother Oncol*. 2009 Nov;93(2):311-5.
- [5] Schmid MP, Kirisits C, Nesvacil N, Dimopoulos JC, Berger D, Potter R. Local recurrences in cervical cancer patients in the setting of image-guided brachytherapy: a comparison of spatial dose distribution within a matched-pair analysis. *Radiother Oncol*. Sep;100(3):468-72.
- [6] Georg P, Kirisits C, Goldner G, Dorr W, Hammer J, Potzi R, et al. Correlation of dose-volume parameters, endoscopic and clinical rectal side effects in cervix cancer patients treated with definitive radiotherapy including MRI-based brachytherapy. *Radiother Oncol*. 2009 May;91(2):173-80.
- [7] Kirkpatrick JP, van der Kogel AJ, Schultheiss TE. Radiation dose-volume effects in the spinal cord. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. Mar 1;76(3 Suppl):S42-9.
- [8] Lawrence YR, Li XA, el Naqa I, Hahn CA, Marks LB, Merchant TE, et al. Radiation dose-volume effects in the brain. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. Mar 1;76(3 Suppl):S20-7.
- [9] Mayo C, Martel MK, Marks LB, Flickinger J, Nam J, Kirkpatrick J. Radiation dose-volume effects of optic nerves and chiasm. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. Mar 1;76(3 Suppl):S28-35.
- [10] Mayo C, Yorke E, Merchant TE. Radiation associated brainstem injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. Mar 1;76(3 Suppl):S36-41.
- [11] Cummings BJ, Hodson DI, Bush RS. Chordoma: the results of megavoltage radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1983 May;9(5):633-42.
- [12] Pearlman AW, Friedman M. Radical radiation therapy of chordoma. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med*. 1970 Feb;108(2):332-41.
- [13] Austin JP, Urie MM, Cardenosa G, Munzenrider JE. Probable causes of recurrence in patients with chordoma and chondrosarcoma of the base of skull and cervical spine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1993 Feb 15;25(3):439-44.
- [14] Hug EB, Loredò LN, Slater JD, DeVries A, Grove RI, Schaefer RA, et al. Proton radiation therapy for chordomas and chondrosarcomas of the skull base. *J Neurosurg*. 1999 Sep;91(3):432-9.
- [15] Terahara A, Niemierko A, Goitein M, Finkelstein D, Hug E, Liebsch N, et al. Analysis of the relationship between tumor dose inhomogeneity and local control in patients with skull base chordoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1999 Sep 1;45(2):351-8.
- [16] Takahashi S, Kawase T, Yoshida K, Hasegawa A, Mizoe JE. Skull base chordomas: efficacy of surgery followed by carbon ion radiotherapy. *Acta Neurochir (Wien)*. 2009 Jul;151(7):759-69.
- [17] Nikoghosyan AV, Karapanagiotou-Schenkel I, Munter MW, Jensen AD, Combs SE, Debus J. Randomised trial of proton vs. carbon ion radiation therapy in patients with chordoma of the skull base, clinical phase III study HIT-1-Study. *BMC Cancer*.10:607.

- [18] Tzortzidis F, Elahi F, Wright D, Natarajan SK, Sekhar LN. Patient outcome at long-term follow-up after aggressive microsurgical resection of cranial base chordomas. *Neurosurgery*. 2006 Aug;59(2):230-7; discussion -7.
- [19] Tsujii H, Mizoe JE, Kamada T, Baba M, Kato S, Kato H, et al. Overview of clinical experiences on carbon ion radiotherapy at NIRS. *Radiother Oncol*. 2004 Dec;73 Suppl 2:S41-9.
- [20] Noel G, Feuvret L, Ferrand R, Boisserie G, Mazon JJ, Habrand JL. Radiotherapeutic factors in the management of cervical-basal chordomas and chondrosarcomas. *Neurosurgery*. 2004 Dec;55(6):1252-60; discussion 60-2.
- [21] Noel G, Habrand JL, Jauffret E, de Crevoisier R, Dederke S, Mammar H, et al. Radiation therapy for chordoma and chondrosarcoma of the skull base and the cervical spine. Prognostic factors and patterns of failure. *Strahlenther Onkol*. 2003 Apr;179(4):241-8.
- [22] Fagundes MA, Hug EB, Liebsch NJ, Daly W, Efrid J, Munzenrider JE. Radiation therapy for chordomas of the base of skull and cervical spine: patterns of failure and outcome after relapse. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1995 Oct 15;33(3):579-84.
- [23] Noel G, Feuvret L, Calugaru V, Dhermain F, Mammar H, Haie-Meder C, et al. Chordomas of the base of the skull and upper cervical spine. One hundred patients irradiated by a 3D conformal technique combining photon and proton beams. *Acta Oncol*. 2005;44(7):700-8.
- [24] Feuvret L, Noel G, Weber DC, Pommier P, Ferrand R, De Marzi L, et al. A treatment planning comparison of combined photon-proton beams versus proton beams-only for the treatment of skull base tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007 Nov 1;69(3):944-54.
- [25] Al-Sahaf O, Wang JH, Browne TJ, Cotter TG, Redmond HP. Surgical injury enhances the expression of genes that mediate breast cancer metastasis to the lung. *Annals of surgery*. Dec;252(6):1037-43.
- [26] Combs SE, Kalbe A, Nikoghosyan A, Ackermann B, Jakel O, Haberer T, et al. Carbon ion radiotherapy performed as re-irradiation using active beam delivery in patients with tumors of the brain, skull base and sacral region. *Radiother Oncol*. Jan;98(1):63-7.
- [27] Gupta T, Jain S, Agarwal JP, Ghosh-Laskar S, Phurailatpam R, Pai-Shetty R, et al. Prospective assessment of patterns of failure after high-precision definitive (chemo)radiation in head-and-neck squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. Jun 1;80(2):522-31.
- [28] Hu W, Graff P, Boettger T, Pouliot J. A spatially encoded dose difference maximal intensity projection map for patient dose evaluation: a new first line patient quality assurance tool. *Medical physics*. Apr;38(4):1748-53.
- [29] Cheung J, Aubry JF, Yom SS, Gottschalk AR, Celi JC, Pouliot J. Dose recalculation and the Dose-Guided Radiation Therapy (DGRT) process using megavoltage cone-beam CT. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009 Jun 1;74(2):583-92.
- [30] Grosu AL, Piert M, Weber WA, Jeremic B, Picchio M, Schratzenstaller U, et al. Positron emission tomography for radiation treatment planning. *Strahlenther Onkol*. 2005 Aug;181(8):483-99.
- [31] Schoder H, Ong SC. Fundamentals of molecular imaging: rationale and applications with relevance for radiation oncology. *Seminars in nuclear medicine*. 2008 Mar;38(2):119-28.
- [32] Ling CC, Humm J, Larson S, Amols H, Fuks Z, Leibel S, et al. Towards multidimensional radiotherapy (MD-CRT): biological imaging and biological conformality. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2000 Jun 1;47(3):551-60.
- [33] Nagel CC, Bosmans G, Dekker AL, Ollers MC, De Ruyscher DK, Lambin P, et al. Phased attenuation correction in respiration correlated computed tomography/positron emitted tomography. *Medical physics*. 2006 Jun;33(6):1840-7.
- [34] Bayne M, Hicks RJ, Everitt S, Fimmell N, Ball D, Reynolds J, et al. Reproducibility of "intelligent" contouring of gross tumor volume in non-small-cell lung cancer on PET/CT images using a standardized visual method. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. Jul 15;77(4):1151-7.

- [35] Allal AS, Slosman DO, Kebdani T, Allaoua M, Lehmann W, Dulguerov P. Prediction of outcome in head-and-neck cancer patients using the standardized uptake value of 2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004 Aug 1;59(5):1295-300.
- [36] Bradley J, Bae K, Choi N, Forster K, Siegel BA, Brunetti J, et al. A phase II comparative study of gross tumor volume definition with or without PET/CT fusion in dosimetric planning for non-small-cell lung cancer (NSCLC): primary analysis of Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) 0515. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* Jan 1;82(1):435-41 e1.
- [37] Engert A, Haverkamp H, Kobe C, Markova J, Renner C, Ho A, et al. Reduced-intensity chemotherapy and PET-guided radiotherapy in patients with advanced stage Hodgkin's lymphoma (HD15 trial): a randomised, open-label, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet.* May 12;379(9828):1791-9.
- [38] Scarfone C, Lavelly WC, Cmelak AJ, Delbeke D, Martin WH, Billheimer D, et al. Prospective feasibility trial of radiotherapy target definition for head and neck cancer using 3-dimensional PET and CT imaging. *J Nucl Med.* 2004 Apr;45(4):543-52.
- [39] van Loon J, Siedschlag C, Stroom J, Blauwgeers H, van Suylen RJ, Kneegens J, et al. Microscopic disease extension in three dimensions for non-small-cell lung cancer: development of a prediction model using pathology-validated positron emission tomography and computed tomography features. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* Jan 1;82(1):448-56.
- [40] Lee IH, Piert M, Gomez-Hassan D, Junck L, Rogers L, Hayman J, et al. Association of 11C-methionine PET uptake with site of failure after concurrent temozolomide and radiation for primary glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009 Feb 1;73(2):479-85.
- [41] Piroth MD, Holy R, Pinkawa M, Stoffels G, Kaiser HJ, Galldiks N, et al. Prognostic impact of postoperative, pre-irradiation (18)F-fluoroethyl-L-tyrosine uptake in glioblastoma patients treated with radiochemotherapy. *Radiother Oncol.* May;99(2):218-24.
- [42] Mayr NA, Wang JZ, Lo SS, Zhang D, Grecula JC, Lu L, et al. Translating response during therapy into ultimate treatment outcome: a personalized 4-dimensional MRI tumor volumetric regression approach in cervical cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* Mar 1;76(3):719-27.
- [43] Moffat BA, Chenevert TL, Lawrence TS, Meyer CR, Johnson TD, Dong Q, et al. Functional diffusion map: a noninvasive MRI biomarker for early stratification of clinical brain tumor response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2005 Apr 12;102(15):5524-9.
- [44] Abramyuk A, Tokalov S, Zophel K, Koch A, Szluha Lazanyi K, Gillham C, et al. Is pre-therapeutic FDG-PET/CT capable to detect high risk tumor subvolumes responsible for local failure in non-small cell lung cancer? *Radiother Oncol.* 2009 Jun;91(3):399-404.
- [45] Mac Manus MP, Hicks RJ, Matthews JP, Wirth A, Rischin D, Ball DL. Metabolic (FDG-PET) response after radical radiotherapy/chemoradiotherapy for non-small cell lung cancer correlates with patterns of failure. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands).* 2005 Jul;49(1):95-108.
- [46] Marks LB. The pulmonary effects of thoracic irradiation. *Oncology (Williston Park, NY).* 1994 Jun;8(6):89-106; discussion 0, 3-4.
- [47] Fan M, Marks LB, Hollis D, Bentel GG, Anscher MS, Sibley G, et al. Can we predict radiation-induced changes in pulmonary function based on the sum of predicted regional dysfunction? *J Clin Oncol.* 2001 Jan 15;19(2):543-50.
- [48] Marks LB. Dosimetric predictors of radiation-induced lung injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2002 Oct 1;54(2):313-6.
- [49] Cao Y, Platt JF, Francis IR, Balter JM, Pan C, Normolle D, et al. The prediction of radiation-induced liver dysfunction using a local dose and regional venous perfusion model. *Medical physics.* 2007 Feb;34(2):604-12.
- [50] Hahn CA, Zhou SM, Raynor R, Tisch A, Light K, Shafman T, et al. Dose-dependent effects of radiation therapy on cerebral blood flow, metabolism, and neurocognitive dysfunction. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009 Mar 15;73(4):1082-7.

- [51] Buus S, Grau C, Munk OL, Bender D, Jensen K, Keiding S. 11C-methionine PET, a novel method for measuring regional salivary gland function after radiotherapy of head and neck cancer. *Radiother Oncol*. 2004 Dec;73(3):289-96.
- [52] Belka C, Budach W, Kortmann RD, Bamberg M. Radiation induced CNS toxicity--molecular and cellular mechanisms. *Br J Cancer*. 2001 Nov 2;85(9):1233-9.
- [53] Bassler PJ, Pajevic S, Pierpaoli C, Duda J, Aldroubi A. In vivo fiber tractography using DT-MRI data. *Magn Reson Med*. 2000 Oct;44(4):625-32.
- [54] Geets X, Daisne JF, Tomsej M, Duprez T, Lonneux M, Gregoire V. Impact of the type of imaging modality on target volumes delineation and dose distribution in pharyngo-laryngeal squamous cell carcinoma: comparison between pre- and per-treatment studies. *Radiother Oncol*. 2006 Mar;78(3):291-7.
- [55] Mac Manus MP, Ding Z, Hogg A, Herschtal A, Binns D, Ball DL, et al. Association between pulmonary uptake of fluorodeoxyglucose detected by positron emission tomography scanning after radiation therapy for non-small-cell lung cancer and radiation pneumonitis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. Aug 1;80(5):1365-71.
- [56] McGuire SM, Zhou S, Marks LB, Dewhirst M, Yin FF, Das SK. A methodology for using SPECT to reduce intensity-modulated radiation therapy (IMRT) dose to functioning lung. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006 Dec 1;66(5):1543-52.
- [57] Ataman OU, Barrett A, Filleron T, Kramar A. Optimization of follow-up timing from study of patterns of first failure after primary treatment. An example from patients with NSCLC: a study of the REACT working group of ESTRO. *Radiother Oncol*. 2006 Jan;78(1):95-100.
- [58] Ng WT, Lee MC, Hung WM, Choi CW, Lee KC, Chan OS, et al. Clinical outcomes and patterns of failure after intensity-modulated radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. Feb 1;79(2):420-8.
- [59] Dobelbower MC, Burnett Iii OL, Nordal RA, Nabors LB, Markert JM, Hyatt MD, et al. Patterns of failure for glioblastoma multiforme following concurrent radiation and temozolomide. *Journal of medical imaging and radiation oncology*. Feb;55(1):77-81.
- [60] Dawson LA, Anzai Y, Marsh L, Martel MK, Paulino A, Ship JA, et al. Patterns of local-regional recurrence following parotid-sparing conformal and segmental intensity-modulated radiotherapy for head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2000 Mar 15;46(5):1117-26.
- [61] Nijkamp J, Kusters M, Beets-Tan RG, Martijn H, Beets GL, van de Velde CJ, et al. Three-dimensional analysis of recurrence patterns in rectal cancer: the cranial border in hypofractionated preoperative radiotherapy can be lowered. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. May 1;80(1):103-10.
- [62] Soto DE, Kessler ML, Piert M, Eisbruch A. Correlation between pretreatment FDG-PET biological target volume and anatomical location of failure after radiation therapy for head and neck cancers. *Radiother Oncol*. 2008 Oct;89(1):13-8.
- [63] Weber DC, Casanova N, Zilli T, Buchegger F, Rouzaud M, Nouet P, et al. Recurrence pattern after [(18)F]fluoroethyltyrosine-positron emission tomography-guided radiotherapy for high-grade glioma: a prospective study. *Radiother Oncol*. 2009 Dec;93(3):586-92.
- [64] Chao KS, Bosch WR, Mutic S, Lewis JS, Dehdashti F, Mintun MA, et al. A novel approach to overcome hypoxic tumor resistance: Cu-ATSM-guided intensity-modulated radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001 Mar 15;49(4):1171-82.
- [65] Alber M, Paulsen F, Eschmann SM, Machulla HJ. On biologically conformal boost dose optimization. *Physics in medicine and biology*. 2003 Jan 21;48(2):N31-5.
- [66] Buettner F, Gulliford SL, Webb S, Sydes MR, Dearnaley DP, Partridge M. Assessing correlations between the spatial distribution of the dose to the rectal wall and late rectal toxicity after prostate radiotherapy: an analysis of data from the MRC RT01 trial (ISRCTN 47772397). *Physics in medicine and biology*. 2009 Nov 7;54(21):6535-48.

- [67] Jakel O, Reiss P. The influence of metal artefacts on the range of ion beams. *Physics in medicine and biology*. 2007 Feb 7;52(3):635-44.
- [68] Jones B. Implications of quality adjusted survival for clinical trials in radiation oncology. *The British journal of radiology*. 2006 Apr;79(940):353-5.
- [69] Bassler N, Jakel O, Sondergaard CS, Petersen JB. Dose- and LET-painting with particle therapy. *Acta Oncol*. Oct;49(7):1170-6.
- [70] Barendsen GW, Koot CJ, Van Kersen GR, Bewley DK, Field SB, Parnell CJ. The effect of oxygen on impairment of the proliferative capacity of human cells in culture by ionizing radiations of different LET. *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine*. 1966;10(4):317-27.
- [71] Furusawa Y, Fukutsu K, Aoki M, Itsukaichi H, Eguchi-Kasai K, Ohara H, et al. Inactivation of aerobic and hypoxic cells from three different cell lines by accelerated (3)He-, (12)C- and (20)Ne-ion beams. *Radiation research*. 2000 Nov;154(5):485-96.
- [72] Lomax AJ. Charged particle therapy: the physics of interaction. *Cancer journal (Sudbury, Mass)*. 2009 Jul-Aug;15(4):285-91.
- [73] Phillips MH, Pedroni E, Blattmann H, Boehringer T, Coray A, Scheib S. Effects of respiratory motion on dose uniformity with a charged particle scanning method. *Physics in medicine and biology*. 1992 Jan;37(1):223-34.
- [74] van de Water S, Kreuger R, Zenklusen S, Hug E, Lomax AJ. Tumour tracking with scanned proton beams: assessing the accuracy and practicalities. *Physics in medicine and biology*. 2009 Nov 7;54(21):6549-63.
- [75] Ponisch F, Parodi K, Hasch BG, Enghardt W. The modelling of positron emitter production and PET imaging during carbon ion therapy. *Physics in medicine and biology*. 2004 Dec 7;49(23):5217-32.

APPENDIX

In the following material an exemplary CRF for outcome analysis is presented. This CRF has to be adapted according to the specific needs of the investigated tumour site. In general, target volume definitions and DVH analysis should follow the principles as explained in previous work packages. However, assessment of subvolumes of the tumour/target volumes (e.g. high risk CTV, low risk CTV) as well as definition of specific dose parameters may be reasonable in selected tumour sites.

***EXEMPLARY CRF FOR OUTCOME ASSESSMENT
IN CIRT***

Study name/acronym

CIRT center

TPS; version

Patient

Initial performance status (ECOG 0/1/2/3/4)

Weight (kg)

Initial symptoms

Tumor assessment

tumor location and extension

prior-RT GTV volume

prior-RT GTV largest dimension

imaging modalities

- PET (radiotracer) (FDG, MISO, 5-FP....) area of uptake, SUV max
- description of BTV if relevant
- MRI
- CT-scan

Previous treatment of the present tumour

- Chemotherapy (number of cycles)
- Surgery: number of surgeries, time between first and last surgery, pathways, margins quality
- RT: date, dose, fractionation, technique, balistics, DVH, tolerance

Planned RT course

Modalities

- definitive particle therapy
- combined modalities

Prescribed dose

Target volume	Prescribed dose (Gy)	technique	Fractionation		
		If combined photon technique, precise	Dose per fraction (Gy)	Nb of fractions	Treatment duration (days) = last date – first date
GTV					
High risk CTV					
Low risk CTV					

Example for possible high risk and low risk CTV definition in CIRT for skull base chordoma:

GTV is the visible residual tumor on the pre-radiotherapy CT and/or MRI scan.

HR-CTV includes the surgical bed around the residual GTV (R2 surgery in most cases) defined according to the pre-operative CT and/or MRI scan

LR-CTV includes:

- The HR-CTV + 5 mm isotropic expansion, excluding anatomical barriers (uninvaded neurological or bone structures)
- The whole clivus
- The two cavernous sinuses
- When first trans-sphenoidal and / or the HR-CTV includes the sphenoid sinus in part: all the walls of the sphenoid sinus
- For other anterior approaches: the mucosa of the posterior pharyngeal wall next to the HR-CTV (included within automatic expansion around the GTV in most cases)
- Fat filling in the tumor bed (fat beyond is not included in the CTV-BR)

Treatment planning data

Target volume	Volume (mL)	Absorbed Dose ICRU point	W _{isoE}	D _{relative} (e.g. 50%)	D _{relative} (e.g. 98%)	D _{relative} (e.g. 2%)	D _{absolute} (e.g. 2cc)	D _{absolute} (e.g. 0,1cc)	Heter. index	Conf. index
GTV										
High risk CTV										
Low risk CTV										
High risk PTV										
Low risk PTV										

Target volume	Volume (mL)	Absorbed Dose ICRU point	W _{isoE}	D _{relative} (e.g. 50%)	α/β	D _{relative} (e.g. 10%)	D _{relative} (e.g. 2%)	D _{absolute} (e.g. 2cc)	D _{absolute} (e.g. 0,1cc)	Heter. index	Conf. index
PRV 1											
PRV2											
PRV3											
PRV4											
PRV5											

Margin from CTV to PTV (mm) – one line for each technique (if not protocolar)

Margin from OAR to PRV (mm) – one line for each technique (if not protocolar)

Interruption?

Q/A and dose-corrected RT course

control imaging (kV, MV, CBCT, PET)

treatment planning deviations :

day/week1 corrections that were done (should have been done): x1, y1, z1

day/week2..... corrections that were done (should have been done): x2, y2, z2

etc

Corrected Treatment data

Target volume	Volume (mL)	Absorbed Dose ICRU point	W _{isoE}	D _{relative} (e.g. 50%)	D _{relative} (e.g. 98%)	D _{relative} (e.g. 2%)	D _{absolute} (e.g. 2cc)	D _{absolute} (e.g. 0,1cc)	V>3% Dmax	V<3% Dmin
GTV										
High risk CTV										
Low risk CTV										
High risk PTV										
Low risk PTV										

Target volume	Volume (mL)	Absorbed Dose ICRU point	W _{isoE}	D _{relative} (e.g. 50%)	D _{relative} (e.g. 10%)	D _{relative} (e.g. 2%)	D _{absolute} (e.g. 2cc)	D _{absolute} (e.g. 0,1cc)	V>3% Dmax
PRV 1									
PRV2									
PRV3									
PRV4									
PRV5									

Radiobiological model to calculate bioeffective dose from absorbed dose:

Tumor Control/toxicity

one page /M2, M4, M6..... M24

Performance status (ECOG 0/1/2/3/4)

Weight (kg)

Symptoms

Evaluation imaging modality

- PET (radiotracer) (FDG, MISO, 5-FP....) area of uptake, SUV max, extension
- MRI
- CT-scan

GTV largest dimension

GTV volume

- Complete response
- Partial response
- Stable disease
- Progressive disease

Tumor recurrence

- in radiation field
 - central within GTV
 - marginal within CTV (high risk, low risk etc.)
- out of radiation field
- distant

Relapse GTV delineation and superimposition on planning CT:

volume of relapse GTV \cap initial GTV

volume of relapse GTV \cap initial CTV

volume of relapse GTV \cap initial PTV

QOL (6, 18 month, end of study visit)

Adverse events/complications since last visit (CTACEv4.0)

Injured OAR delineation and superimposition on planning CT (if visible)

volume of injured OAR \cap initial OAR

volume of injured OAR \cap initial PRV



Project co-funded by the European Commission within the FP7 (2007–2014)

Grant agreement no.: 228436

ULICE

Union of Light Centres in Europe

Project type: Combination of CP & CSA
 Integrating Activities / e-Infrastructures / Preparatory phase

Start date of project: 1st September 2009 Duration: 60 months

D.JRA 2.9 - Integrated Concept of 3D/4D Absorbed Dose and Variations of Biological Effects with RBE, Fractionation and Overall Time
Delivery date: (month 60) 14/08/31

WP2 – Concepts and terms for dose volume parameters and for outcome assessment in hadron-therapy integrating applied biology, medical physics and clinical medicine in ULICE

WP leader: Ulrike Mock, Jacques Balosso

Reporting period: 4th

	Name	Partner	2014/08/31
Authors:	Jacques Balosso Guillaume Vogin André Wambersie	UCBL UCBL MUW	
Contributors:	Michael Beuve Michael Kraemer Giulio Magrin	UCBL GSI MEDA	
Pillar coordinator:	Richard Pötter	MUW	
Approved by TPB and CPO		signature	

Dissemination Level		
PU	Public	
PP	Restricted to other programme participants (including the Commission Services)	
RE	Restricted to a group specified by the consortium (including the Commission Services)	
CO	Confidential, only for members of the consortium (including the Commission Services)	

TABLE OF CONTENTS

LIST OF ABBREVIATIONS AND DEFINITIONS	4
PUBLISHABLE SUMMARY	8
1 Introduction	12
1.1 Evaluation of a new treatment technique	12
1.2 Summary of the medical history: staging and outcome	12
1.3 Multidisciplinary Oncology	12
1.4 The absorbed dose	12
1.5 The 3D/4D dose distribution concept	12
1.6 From (physical) absorbed dose to biologically transformed (weighted) absorbed dose	13
1.7 The equieffective and isoeffective dose concepts	14
2 Bioeffective dose concepts	15
2.1 The equieffective absorbed dose and equieffective treatment	15
2.1.1 Definition	15
2.1.2 Selection of the reference treatment conditions for comparison	15
2.2 The isoeffective absorbed dose concept	16
2.3 Field of application, quantities and units	18
2.4 Other bioeffective dose concepts	18
2.4.1 EQD2, equieffective dose in 2-Gy per fraction	18
2.4.2 Possible extension of the EQD2 concept to the EQDX α/β formalism	19
3 Volume concepts in oncology and radiation therapy	20
3.1 Oncological, radiation therapy and normal tissues at risk volumes	20
3.1.1 Imaging in 3D and 4D	21
3.2 General oncological volume concepts	21
3.2.1 Gross tumour volume(s), GTV	21
3.2.1.1 Definition	21
3.2.1.2 Variation in the delineation of the GTV due to pathology and observers bias	22
3.2.1.3 Variation of GTV with anatomic and functional imaging technique	22
3.2.1.4 Identification of functional sub-GTV(s)	23
3.2.1.5 The composite GTV	23
3.2.1.6 Variations of GTV with time (4D): adaptive approach	26
3.2.1.7 Reporting the GTV	26
3.2.2 Clinical target volume (CTV)	26
3.2.2.1 Definition	26
3.2.2.2 Delineation of the CTV	27
3.2.2.3 Risk-related CTV	29
3.2.2.4 Adaptive concept for CTV assessment	29
3.2.2.5 Reporting the CTV	30
3.3 Radiation therapy volume concepts	30
3.3.1 Introduction	30
3.3.2 The Planning Target Volume, PTV	30
3.3.2.1 Definition	30
3.3.2.2 Delineation of the PTV	31
3.3.2.3 Specific issues when delineating the PTV in particle-beam therapy	32
3.3.2.4 Reporting the PTV	33
3.4 Normal tissue related volume concepts	34
3.4.1 Introduction into treatment related morbidity and Quality of Life in oncology	34
3.4.2 Organs at Risk (OARs)	34

3.4.3	Planning Organ at Risk Volumes (PRV)	34
3.4.4	Remaining volume at risk (RVR) and OARs	35
4	Approach for dose specification: reference points and/or DVH	36
4.1	Introduction	36
4.2	Selection of reference points for prescribing and reporting	36
4.3	Dose-volume histograms (DVH) and selection of dose values on the DVH curve for prescribing and reporting	37
4.4	Two approaches for prescribing and reporting: using reference points and/or DVH	39
5	Relative Biological Effectiveness (RBE) and other relevant biological factors	42
5.1	Radiation quality: the LET and microdosimetric approach	42
5.2	Relative Biological Effectiveness, RBE	42
5.2.1	Definition of RBE	42
5.2.2	Reference radiation quality	43
5.3	Practical issues raised by the RBE in clinical practice	43
5.4	Specific RBE issues in carbon-ion therapy	43
5.4.1	Carbon-ion beams have different LET spectra and RBE as function of depth	43
5.4.2	Secondary particles contribution to the energy deposition	44
5.4.3	The low number of fractions and short overall times in carbon-ion therapy makes time parameters crucial	44
5.4.4	The multiplicity of the models	44
5.5	Approaches to available the RBE and equieffective treatment for carbon-ion applications	44
5.5.1	The classic NIRS approach	45
5.5.2	The GSI approach	45
5.5.3	A new NIRS approach	47
5.6	Radiation quality measurements of ion-beam therapy facilities	47
6	Research and development in particle-beam therapy	51
6.1	In the field of oncology - Uncertainties on the CTV and PTV	51
6.2	In the field of engineering, physics, dosimetry	51
6.3	In the field of radiobiology	51
6.4	Treatment planning in particle beam therapy and related uncertainties	51
7	Conclusions and recommendations in ion-beam therapy	53
7.1	Treatment conditions	53
7.2	Summary of the medical history	53
7.2.1	Clinical data collection and patient follow-up	53
7.3	Quantities and units for prescribing and reporting	53
7.4	Treatment prescription and reporting	54
7.5	Reporting DVH(s) versus doses at reference point(s)	54
7.6	The reported volumes in ion-beam therapy	55
	REFERENCES	57

LIST OF ABBREVIATIONS AND DEFINITIONS

AJCC	American Joint Committee on Cancer is an organisation best known for defining and popularising cancer staging standards.
BIPM	Bureau International des Poids et Mesures (International Bureau of Weights and Measures) is an international standards organisation established to maintain the International System of Units (SI) under the terms of the Metre Convention.
CT	Computed Tomography is a medical imaging technique using a large series of two-dimensional X-ray images.
CTV	Clinical Target Volume is a volume of tissue that contains a demonstrable GTV and/or subclinical malignant disease at a certain probability considered relevant for therapy.
D	Absorbed dose is a measure of the energy deposited per unit mass of medium by ionising radiation, and so has the unit Gy.
DIBH	Deep-inspiration breath-hold
DIsoE	Isoeffective dose is the absorbed dose that delivered under the reference conditions would produce the same biological effect in a given system as the actual treatment, all other conditions being the same.
Dref	Dose of the reference radiation quality selected for the definition of the RBE.
DRR	Digitally reconstructed radiograph
Dtest	Dose of the test radiation quality used for the definition of the RBE.
Duty cycle	The fraction of time a radiation beam is active during the delivery of a respiratory-gated treatment field
DVH	Dose-Volume Histogram is a concept used in radiation treatment planning.
Exhale	Resting expiratory level
FB	Free breathing
FDG	Fluorodeoxyglucose is a radiopharmaceutical used in PET imaging.
fMRI	functional Magnetic Resonance Imaging is a type of specialised MRI scan measuring the hemodynamic response (change in blood flow) related to neural activity.
Gate	A device that (for this application) restricts image acquisition or treatment delivery to a particular part of the respiratory cycle
GSI	Gesellschaft für SchwerIonenforschung – Centre for Heavy Ion Research located at Darmstadt, Germany
GTV	Gross Tumour Volume is the gross demonstrable extent and location of a tumour.
Gy	Gray is the name of the special unit of absorbed dose of ionising radiation, i. e. the absorption of one joule of ionising radiation by one kilogram of matter.

HIMAC	Heavy Ion Medical ACcelerator located at the National Institute of Radiological Sci-ences in Chiba, Japan.
HIT	Heidelberger Ionenstrahl-Therapiezentrum – Heidelberg Ion-Beam Therapy Centre lo-cated at the Heidelberg University Hospital, Germany.
ICD-O	International Classification of Diseases for Oncology is a domain specific extension of the International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems for tumour diseases. This classification is widely used by cancer registries.
ICRP	International Commission on Radiological Protection is an advisory body providing recommendations and guidance on radiation protection.
ICRU	International Commission on Radiation Units and Measurements is a standardisation body set up in 1925 by the International Congress of Radiology.
IMRT	Intensity-Modulated Radiation Therapy is an advanced type of high-precision radiation therapy technique.
Inhale	Resting inspiratory level
Interfraction	Occurring between treatment sessions
Intrafraction	Occurring within a treatment session
ITV	Internal Target Volume is defined as the CTV plus a margin which takes into account uncertainties in size and shape of the CTV and its position/movements within the pa-tient.
LEM	Local Effect Model used for the treatment planning system for ion therapy TRiP at GSI and HIT, Germany.
LET	Linear Energy Transfer is a measure of the energy transferred to material as an ionising particle travels through it.
MRI	Magnetic Resonance Imaging is a medical imaging technique using a powerful mag-netic field.
MRI-FLAIR	Magnetic Resonance Imaging FLuid Attenuated Inversion Recovery is a pulse sequence (inversion recovery technique that nulls fluids) used in MRI.
NIRS	National Institute of Radiological Sciences located at Chiba, Japan
OAR	Organ At Risk or critical normal structures are tissues, which if irradiated could suffer significant morbidity, and thus might influence the treatment planning and/or the dose prescription.
OER	Oxygen Enhancement Ratio in radiobiology refers to the enhancement of therapeutic or detrimental effect of ionising radiation due to the presence of oxygen.
PET	Positron Emission Tomography is a medical imaging technique using pairs of gamma rays emitted indirectly by a positron-emitting radionuclide.
PET-CT	Positron Emission Tomography and Computed Tomography is a medical imaging de-vice which combines in a single gantry system both a PET and a CT.
Phase	A particular stage in a periodic process (e.g., regular respiratory motion)
PRV	Planning Organ at risk Volume is, in analogy with the PTV, a geometrical concept con-sidering uncertainties and variations in the position of organs at risk during treatment.

PTV	Planning Target Volume is a geometrical concept introduced for treatment planning and evaluation. It is the recommended tool to shape dose distributions to ensure that the prescribed dose will actually be delivered to all parts of the CTV, with a clinically acceptable probability, despite geometrical uncertainties such as organ motion and set-up variations. It is used for dose prescription and reporting.
PTV	Planning target volume
Range of motion	Displacement between inhale and exhale
RBE	Relative Biological Effectiveness is defined as the ratio of a dose of a reference radiation quality to the dose of the test radiation quality required to cause the same biological level of effect, all other conditions being the same.
RC	Respiratory correlated
Respiratory gated	The synchronization of imaging and radiation delivery with respiration, such that image acquisition/radiation delivery only occurs during a certain part of the respiratory cycle
Respiratory synchronized	The synchronization of radiation delivery with respiration via movement of the linear accelerator or the patient such that the radiation beam is following the tumour during treatment
RVR	Remaining Volume at Risk is the volume that is within the imaged region of the patient, and outside all delineated OARs and CTVs.
SOPB	Spread-Out Bragg peak is an overlap of several pristine Bragg peaks at staggered depths.
SUV	Standardised Uptake Value is often used in PET imaging for (semi-)quantitative analysis of dynamic data. It is useful for a simple analysis of FDG images, e. g. to monitor the progress of disease during cancer therapy.
TNM	Classification of Malignant Tumours is a cancer staging system that describes the extent of cancer in a patient's body. T describes the size of the tumour and whether it has invaded nearby tissue; N describes regional lymph nodes that are involved; M describes distant metastasis (spread of cancer from one body part to another).
TPS	Treatment Planning System used in radiation therapy for planning the doses in the tumour and the surrounding healthy tissue (critical organs).
TRiP	Treatment planning for Particles a treatment planning system for ion therapy developed at GSI and used at HIT, Germany.
TV	Treated Volume is the volume of tissue that receives at least the dose specified by the radiation oncologist in charge of the patient and considered as appropriate to achieve the goal of the treatment within the bounds of acceptable complications.
UICC	International Union Against Cancer is a non-governmental organisation dedicated exclusively to the global control of cancer.
VOI	Volume Of Interest is a generic term that can be used to refer to any volume that needs to be identified. The GTV, PTV, and OAR are examples of specifically-named VOIs.
WHO	World Health Organisation is a specialised agency of the United Nations that acts as a coordinating authority on international public health.

WisoE	Weighing factor which takes into account the effects of all factors that could influence the outcome (mainly, dose per fraction, overall time, dose rate and radiation quality). Multiplication of weighing factor with absorbed dose results in the isoeffective dose.
-------	---

PUBLISHABLE SUMMARY

Introduction

The present report D.JRA 2.9 logically follows WP “Harmonisation of concepts and terms for volume and dose-volume parameters in photon, proton and carbon-ion therapy”, D.JRA 2.1 [ULICE 2011] and “Harmonisation and recommendations for prescribing and reporting absorbed doses and dose-volume histogrammes based on 3D and 4D concepts”, D.JRA 2.5, [ULICE 2012].

It completes the subject discussing how the time factors and radiation quality are associated to the concepts of absorbed dose and equieffective dose and ultimately affect the therapy outcome

Comparison with the data from established photon and other modern facilities is essential. It implies harmonisation on the patient series (staging) and outcome (tumour control and side effects). On the other hand, the irradiation technique has to be described accurately and completely. This should allow to understand, interpret and eventually reproduce (if needed) the therapeutic application.

Bioeffective dose concepts: the equieffective dose

For the same absorbed dose, the biological/clinical effect depends on the irradiation parameters (fractionation, overall time, radiation quality, etc), the biological system and effect (i.e., endpoint) and the physiological conditions (i.e., oxygenation). Therefore treatments delivered in different technical conditions cannot simply be compared, added nor combined.

The concept of “equieffective dose”, D_{Equi} , has been developed to allow comparing, combining or adding the doses prescribed (or delivered) when two or more different techniques are applied. This concept has been developed exclusively for radiation-therapy applications.

The equieffective dose is defined as the product of the absorbed dose and a transformation function that includes all parameters influencing the biological effect/outcome i.e., irradiation parameters and endpoint. Equieffective doses delivered under different (but specified) conditions can thus be compared, added or combined as they produce radiobiological endpoints/clinical outcomes with the same probability.

Equieffective treatments may be, among other parameters, be characterised by usually different (physical) absorbed doses but the same equieffective doses (that of the reference treatment).

The absorbed doses and the equieffective doses are both expressed in Gy. The use of the same unit to express two quantities may include a risk of confusion.

Volume concepts in oncology and radiation therapy

The volumes described in this report are those recommended in the successive ICRU reports and already included in the previous ULICE D.JRA 2.1 and 2.5.

When reporting the Gross Tumour Volume (GTV) two points are stressed in this report. The methods used to delineate the GTV have to be specified because different examination methods may lead to different results. Secondly the time (4D) when the GTV is measured have to be specified because its dimensions and shape may change during treatment (adaptive approach).

Similar recommendations (4D) apply when reporting the Clinical Target Volume (CTV) and the Planning target volume (PTV).

For normal tissues, the Organs at Risk (OARs), Planning organ at Risk Volumes (PRV) and Remaining Volume at Risk (RVR) are defined.

Dose specification for prescribing and reporting

Our irradiation techniques are not so perfect that the dose distributions in the volumes of interest are never exactly what they are planned or should have been. Therefore harmonisation is needed on how to report the dose distributions in the relevant volumes and reference points. The ICRU has recently recommended specifying the dose to the PTV based on the Dose-Volume-Histogramme, DVH, curve: D50 (median dose), D98 and D02. In addition the dose levels at reference points may be reported with the advantage of specific geometric relations.

Today the technological developments allow to perform routinely DVH using both quantities, the absorbed dose and equieffective dose. These data, together with the set of clinical data which describe tumour control and side effects also related to fractionation and overall time, form the basis of the information to be registered that can be recommended as a current practice in ion-beam therapy.

Relative Biological Effectiveness (RBE) an other relevant biological factors

The classical concepts of radiation quality, microdosimetric parameters, LET and RBE are recalled.

In ion-beam therapy, specific issues for selecting the RBE for clinical applications have to be taken into account:

- carbon-ion beams have different LET spectra as a function of depth. This introduces an additional factor of inhomogeneity of the RBE.
- secondary particles resulting from the fragmentation of the carbon ions significantly contribute to the energy deposition.
- the low number of fractions and short overall times introduce a (biological) hypofractionation that makes a true comparison with current fractionated treatments very difficult.

Today, three procedures or models have been or are applied to evaluate the RBE (and incorporate the RBE into TPS):

1. The initial NIRS procedure based on the neutron therapy experience (a “clinical RBE” of 3 for effectiveness and tolerance). It consists on a parametric description of human salivary gland response and rescaling the physical dose.
2. The GSI (Gesellschaft für Scherionenforschung) approach based on the Local Effect Model (LEM). Four successive versions have been developed. The equieffective dose is computed point by point (“voxel”) in the PTV taking into account different factors: local LET, absorbed dose, fraction dose, biological endpoint, etc.
3. A new NIRS approach was developed based on Microdosimetric Kinetic Model (LKM). It is planned to be used with a scanning system.

Presently there is no agreement on the biological and bio-physical hypotheses sustaining the different models, making difficult the comparison of the data from the different centres.

It should be stressed that the RBE is not equal to the Transformation Function which is used to derive the equieffective dose. The transformation function includes, in addition to the RBE, other factors such as the fractionation and overall time. The time factors are in general very different for carbon ions and the current photon treatments.

Summary of the recommendations in ion-beam therapy

A brief medical history should include staging and outcome based on international agreed upon criteria.

A complete description of the irradiation technique should be reported including the PTV(s), the relevant volumes and DVH.

In carbon-ion therapy, the doses should be prescribed and reported using the equieffective dose quantity. All factors involved in the transformation function should be specified: irradiation technique, reference treatment and biological endpoints. In addition, the (physical) absorbed doses should be prescribed and reported at the volumes (and reference points) of interest.

The final goal of this D.JRA 2.9 for improving and optimizing modern ion-beam therapy is to provide the basis for a solid methodology that would allow to facilitate exchange of data among different ion-beam facilities and between these facilities and the referring physicians.

1 Introduction

1.1 Evaluation of a new treatment technique

The goal of this work is to favour the development of better cancer treatment, especially by particle therapy. A common language and common concepts are essential to favour exchanges of information and development of international trials which are the best way to boost clinical progress. Evaluation of a novel treatment technique can only be done relative to well established (“historical”) techniques. This implies similarities and homogeneities in the compared patient series in particular patient staging.

1.2 Summary of the medical history: staging and outcome

Staging: time when it was performed and technique.

Tumour location and extent (three dimensional) should be carefully evaluated and reported according to the TNM/AJCC [Edge et al., 2010] or UICC [UICC 2009] cancer-staging systems and the WHO International Code for disease in Oncology (ICD-O) [WHO 2000].

The latest UICC/AJCC TNM staging system (7th edition) has been published in 2009 [UICC 2009],

Outcome: tumour control and side effects to avoid bias when the effects of the treatment are compared [WHO 2000]

1.3 Multidisciplinary Oncology

In modern hospitals, the treatments of cancer patients are increasingly applied in comprehensive cancer centres where the treatment strategies are currently discussed and applied in collaboration/jointly between experts/teams from different disciplines. Present available data tend to indicate that better results are obtained today within cooperative multidisciplinary oncology settings if e.g. protocols and treatments combining the expertise of the different cancer teams are discussed and decided in the frame of multidisciplinary tumorboards or patients treated within multidisciplinary prospective trials [RCR 2008, Kramer 1984, Kesson et.al. 2012].

1.4 The absorbed dose

Absorbed dose is a fundamental and rigorously defined quantity in radiation therapy [BIPM 2006, ICRU 1998, ICRU 2011]. Regardless of the type of radiation and biological system, the radiobiological and clinical effects are always related to the absorbed dose. National and international (i.e., BIPM) standards laboratories guaranty the accuracy and reproducibility of reference absorbed dose measurements. On the other hand, dosimetry protocols are regularly recommended and improved by medical physics associations or commissions for therapeutic irradiations [Nag 2000, IAEA 2007, ICRU 2010, GEC-ESTRO 2010]

In radiation-oncology applications, the clinical outcome is always closely related to absorbed dose. Therefore it has recommended that the absorbed dose distribution (3D) and the associated time factors be reported in an accurate and complete way in order to allow one to understand and interpret the clinical effects and eventually reconstruct the irradiation conditions if needed [ICRU 1999, ICRU 2004, IAEA-ICRU2008, Wambersie 2009].

1.5 The 3D/4D dose distribution concept

More recently, the variation of dose distribution as a function of time has been investigated in terms of 4D-dose distribution. Its importance has been investigated for proton and ion-beam therapy in a previous ULICE report [ULICE 2012].

The integrated concept of 3D/4D is one of the main topics of the present report. Following clinical issues will be considered:

- respiratory motion and heart beat during beam delivery. These are quasi-periodic functions of time [Liu 2007].
- daily variations of respiratory motion.
- variations due to changes in shape/volume of normal tissues. This could be related sometimes to the applied clinical protocols such as bowel preparation.
- tumour growth or shrinkage.
- treatment-related anatomical changes, such as reduction in bronchiole obstructions resulting in variations in regions of atelectasia.

1.6 From (physical) absorbed dose to biologically transformed (weighted) absorbed dose

Absorbed dose is a pure physical quantity; it implies that there is no need to introduce any (or different) biological hypothesis or model. However, the same absorbed dose may produce very different biological or clinical effects depending on the irradiation conditions such as:

- absorbed dose/dose distribution and inhomogeneities/3D and 4D dose distribution
- dose rate (average/instantaneous dose rate),
- fractionation/dose per fraction,
- overall time (and other time-dose relations),
- radiation quality (LET),
- etc.

These conditions are under control and can be selected by the radiation oncologist. Other conditions (e.g., heat, drugs, oxygenation, chemotherapy, etc.) also influence the biological effects. Finally, the effects depend on the biological system and effect ("endpoint") considered (e.g., early or late effects on different types of tumours and normal tissues).

Therefore specification of absorbed dose alone is in general not sufficient to predict the biological effects and clinical responses.

For radiation therapy applications, when exchanging clinical information, when comparing or combining(adding) treatments performed under different technical conditions (i.e., when altering the treatment protocols or designing new protocols), transformation (weighting) of absorbed dose is necessary to predict and compare the ultimate biological effects.

The transformation function has to take into account all factors that could influence the clinical outcome, depending on the treatment protocols that are compared. The numerical values of these transformation functions may vary significantly with the biological systems or endpoint considered, e.g., early or late effects, cancer induction, physiological conditions of the irradiated system and technical irradiation conditions (e.g., degree of oxygenation, temperature). They may also be influenced by the individual radiosensitivity and pathological conditions of the patient, anaemia, previous and/or concomitant chemotherapy that are known to affect the clinical outcome.

In general, late-responding tissues are more sensitive than early responding tissues to a change in dose per fraction, dose rate or radiation LET. The dose per fraction and degree of oxygenation are less important with high-LET radiation.

Lastly, comparison of radiation doses delivered using different therapy modalities implies that they are specified in the same way, i.e., at selected geometrical reference point(s) and/or at points on the DVH.

1.7 The equieffective and isoeffective dose concepts

For these reasons, when the efficiency on tumours and tolerance of normal tissues for different treatments have to be compared, and to make this comparison easier, more objective and avoiding confusion, concepts like "equieffective absorbed dose", "isoeffective" absorbed dose and EQD2 (equieffective dose delivered with 2 Gy per fraction) were introduced by several Commissions/Agencies for radiation therapy applications, e.g. [IAEA 2007, Wambersie 2009, Bentzen 2012, ICRU-GEC-ESTRO]. These radiobiological concepts are discussed in the following paragraphs.

In the case when high-LET radiation therapy (carbon-ions or fast neutrons) is applied, radiation quality (LET and the resulting RBE differences) raises complex issues that are still a matter of clinical and radiobiological debate and controversies.

When comparing treatments delivered in different conditions it is important to avoid bias related to patient selection, method of evaluation of efficiency (on tumour) and scoring of side effects. Some information about the patients thus needs to be provided and expressed in an unambiguous way.

2 Bioeffective dose concepts

This section deals with radiobiological concepts introduced in radiation therapy to allow comparing treatments delivered in different technical conditions. The absorbed doses are transformed (weighted) by factors related to (depending on) the irradiation conditions and selected clinical endpoints with the goal to obtain "bioeffective quantities" that can be compared and should be closely related to the expected biological/clinical effect (Fig 2.1).

2.1 The equieffective absorbed dose and equieffective treatment

2.1.1 Definition

The "equieffective dose" concept has been developed exclusively for radiation-therapy applications for specifying, comparing or combining the doses prescribed (and delivered) when two (or more) different techniques are used.

The "equieffective doses" (D_{EquiE}) are defined as the absorbed doses that, when delivered under different but *specified conditions*, produce the same probability of a given radiobiological endpoint or clinical outcome i.e. treatment outcome. Therefore, the equieffective concept applies to biological endpoints and to treatment results; consequently it is not just a question of dose.

Actually the determination of equieffective doses includes the effects of *all treatment parameters* and conditions such as fraction size, dose rate, overall time, radiation quality, the use of chemotherapy or biological response modifiers and others. The influences of these factors are not independent from each other and their effects depend on the biological system or irradiated tissues and endpoint under consideration. Chemotherapy and biological response modifiers may have an additive, synergistic or protective effect and may have a differential effect on tumour cells, acute responding tissues or late responding tissues [Wambersie 2009].

Equieffective treatments are, among other parameters, characterized by usually different absorbed doses but the same equieffective dose D_{EquiE} (the one of the reference treatment). The absorbed doses and this equieffective dose D_{EquiE} are expressed in Gy. The use of the same unit to express two quantities may include a risk of confusion (see below).

2.1.2 Selection of the reference treatment conditions for comparison

Any comparison between different irradiation treatment techniques implies the selection of reference conditions. The specified and reported numerical values of equieffective doses are thus meaningful only to the extent that the following conditions are fulfilled:

- 1) the irradiation conditions selected as reference for comparison are accurately and completely specified. This includes in particular: fractionation, dose rate, overall time, radiation quality.
- 2) the biological systems and effects (endpoints) for which the equieffective doses are evaluated are specified. Different numerical equieffective dose values could be obtained for different endpoints (e.g., late or early effects, early or late responding tissues).
- 3) the method used for prescribing and reporting the dose is the same for the compared techniques and is specified, e.g., the dose at reference point(s) or a dose value specified on the DVH curve (e.g., D_{50} , D_{90} , D_{98} or others).
- 4) the tissue volume(s) (e.g., CTV, PTV, others) selected for evaluation of the equieffective doses should be the same for the compared techniques and should be specified.
- 5) the biological models and hypotheses used to evaluate the equieffective dose should be specified and be valid for the irradiation schedules that are compared.

The methods used to fulfil these conditions should be clearly and completely specified and reported allowing one to repeat the comparison of the equieffective doses using different biological and clinical models and hypotheses.

It is self-evident that when a collaborative study between different centres is initiated, the same dosimetric reference regarding equieffective doses must be accepted and agreed upon by all participating teams. This means that the above mentioned conditions should be adapted by each centre to meet this endpoint based on the same equieffective dose. A critical point regarding heavy particles is also the adaptation of the calculation models for the physical and the biological parameters implemented into the different TPS's.

2.2 The isoeffective absorbed dose concept

The "isoeffective dose" is defined and can be used in much the same way as equieffective dose except that, when comparing two (or more) radiation treatments delivered under different conditions, the reference treatment technique for isoeffective dose is fixed: photons, delivered using 2 Gy per fraction, 5 fractions per week. The isoeffective dose concept is thus simply a particular case of the equieffective dose concept described above.

Isoeffective dose is expressed in gray just as absorbed dose. When a dose is reported, the corresponding quantity has to be clearly specified: absorbed dose, equieffective or isoeffective dose.

The majority of patients treated in the past and even today with a curative intention with external photon beams receive fractions of 2 Gy, 5 times a week. This schedule was and is widely accepted by the radiation-oncology community. As a result considerable clinical experience has been accumulated with this schedule.

Importantly, the relationship between absorbed dose (numerical values) and clinical outcome using this schedule is well established. This broad clinical experience should not be neglected.

This is the reason why in external photon-beam therapy for the majority of patients, 2 Gy photon fractions, 5 fractions per week was still recommended rather recently [IAEA-ICRU 2008] as a relevant universal reference for comparisons of treatments delivered in different conditions.

It is however recognised that the term "isoeffective" (even isoeffect) can be found in the literature with different meanings which has caused some confusion. In addition for some particular studies, photons delivered with 2 Gy per fraction, 5 fractions per week cannot be taken as the reference treatment and more relevant schedules have to be selected (e.g., for radiosurgery, irradiation of uveal melanoma, comparison of protons and ion beams delivered using different techniques, etc.).

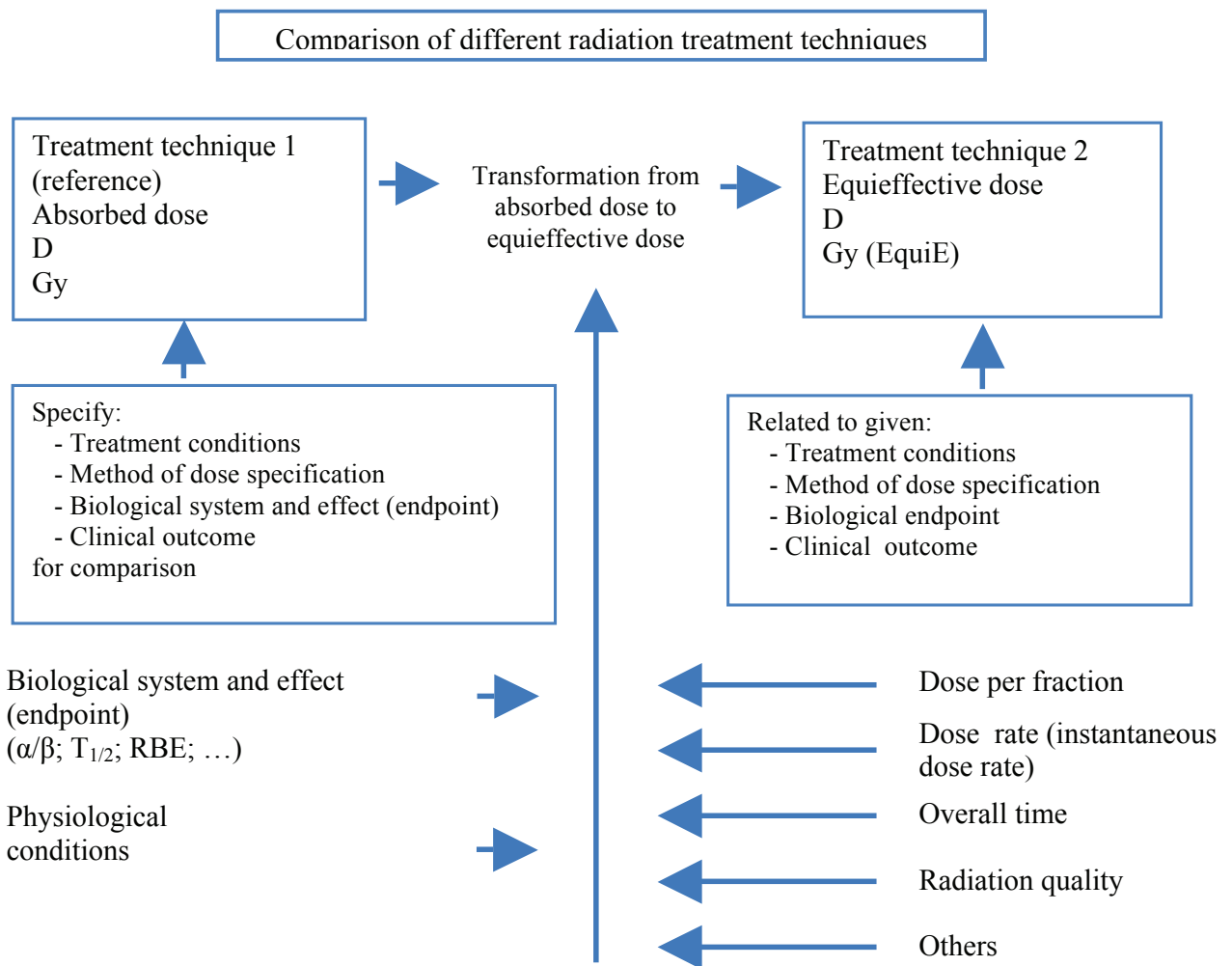


Figure 2.1: Transformation function of absorbed dose, D, to equieffective dose, D_{EquiE} , applicable to all types of radiation therapy techniques. The concept of D_{EquiE} includes the combined effects of all parameters influencing the outcome. In addition, D_{EquiE} depends on the treatment conditions selected for the comparison. These have to be specified.

2.3 Field of application, quantities and units

The concept of equieffective absorbed dose is applicable when any type of radiation treatment is compared to any other treatment delivered using a different technique selected as the reference. This concept can thus be used when comparing treatments delivered using ion beams in different conditions (e.g., type of particles, passive scattering vs scanning beam, depth, etc) .

As mentioned above, the concept of isoeffective absorbed dose is a particular case of the concept of equieffective absorbed dose. The isoeffective absorbed dose implies that the reference treatment conditions are fixed, i.e., photons/cobalt γ rays, 2 Gy per fraction, 5 fractions per week.

The absorbed dose is expressed in gray (Gy). One gray is equal to one joule per kilogramme:

$$1 \text{ Gy} = 1 \text{ J} / 1 \text{ kg}$$

The transformation (weighting) function to go from absorbed dose D to equieffective or isoeffective dose D_{EquiE} is dimension-less. The equi/isoeffective dose is thus also expressed in Gy

$$D_{\text{EquiE}} = (\text{transformation function}) \times D$$

To avoid a confusion between Gy used as the symbol for the (physical) quantity absorbed dose (D) and the quantity equieffective (D_{EquiE}) or isoeffective (D_{IsoE}) dose, it became the current practice in the proton- and carbon-ion radiation-therapy community to use the symbol GyE when the symbol refers to the biologically transformed quantity equieffective dose (D_{EquiE}) or isoeffective dose (D_{IsoE}), without discriminating between both quantities

However, considering the complexity and the previously unachieved outcome of heavy particle therapy, it is presently difficult to select the transforming function and thus to define a real equieffective treatment i.e. to predict the treatment outcome. Therefore, the users are mostly limited to express the differences of relative biological effectiveness of the beam they are using. This way GyE, CGE, and Gy(RBE) appear as limited expressions of a part of the transformation function of an equieffective dose that cannot be defined yet. This practice was introduced to avoid confusions that could result in treatment errors.

Although it is today generally applied in clinical practice, it is not in agreement with the SI system [BIPM 2006] for which the symbol of a quantity (here "Gy") cannot be specified ("decorated") with another initial (GyE), a sign (Gy*), nor a subscript (Gy_{EquiE}). However the following notation e.g., 10 Gy (EquiE) or 10 Gy (IsoE) could be considered for international validation. A space should be introduced between the Gy symbol and its complementation mention (EquiE) or (IsoE) [ICRU 2011]. This way the expression Gy (RBE) could be used.

2.4 Other bioeffective dose concepts

2.4.1 EQD2, equieffective dose in 2-Gy per fraction

The EQD2 concept implies that when comparing and/or combining two (or more) photon treatments delivered with different schedules, the selected reference treatment delivers 2 Gy per fraction. It also implies that the linear-quadratic model (α/β) can be used safely (fractions not larger than ~ 6 Gy).

The potential effect of differences in the overall time is not taken into account in the EQD2 concept.

EQD2 is currently in use [Joiner 2009] and recently recommended for external beam and brachytherapy photon treatments [ICRU-GEC-ESTRO]. For mathematical modelling, it is necessary to indicate the time-dose pattern for photons and the values of the α/β ratio and $T_{1/2}$ parameters.

Historically, the term "equivalence" was included in the terminology EQD2 but this is discouraged because of the possible confusion with the concept of "equivalent dose" recommended by the ICRP for protection purposes [ICRP 2010]

2.4.2 Possible extension of the EQD2 concept to the EQDX α/β formalism

The ICRU report on Bioeffect mathematical modelling [Bentzen 2012], proposes to extend the EQD2 to the EQDX concept which implies that any value of dose per fraction can be taken as the reference. However two choices dominate the published literature to date, $X = 2$ (two) and $X = 0$ (zero). $X = 2$ implies that the treatment is prescribed (and reported) using 2 Gy per fraction. In photon-beam therapy, the radiation oncologists are familiar with the EQD2 numerical dose values. If $X = 0$, EQD0 is equal to the BED (Biologically Effective Dose) i.e., the equieffective dose delivered using absorbed doses per fraction approaching zero Gy- obviously an asymptomatic condition [Fowler 1989].

$$EQDX_{\alpha/\beta} = D (d+\alpha/\beta)/(X+ \alpha/\beta)$$

D is the total (physical) absorbed dose, d is the actual dose per fraction, X is the reference dose per fraction.

The EQDX α/β formalism can be extended to any radiation quality by selection of the appropriate (endpoint-specific) α/β value. For high-LET radiation (carbon-ion beams), the effects of LET (RBE) have to be considered and the biological effects are different in type and size after high- and low-LET irradiation. Late effects are more pronounced than early effects and the influence of dose per fraction is reduced after high-LET irradiation.

The influence of the radiation quality (LET) and, as the result, the RBE raises issues that are specific and important in ion-beam therapy. These issues, which are still a matter of debate, are presented in detail in the next section.

The application of the EQDX α/β concept may be questionable in ion-beam therapy as very different doses per fraction and overall times (not included in the EQDX concept) may be often applied.

Regarding this caveat the concept of equieffective dose is more general and allows taking account for all the parameters related to the treatment conditions and not only the α/β values. It appears therefore more adapted to express and report doses for particle therapy.

3 Volume concepts in oncology and radiation therapy

3.1 Oncological, radiation therapy and normal tissues at risk volumes

Harmonisation in prescribing and reporting a radiation treatment cannot be achieved without an agreement on the volume concepts and terminology. In carbon ion-beam therapy the same volume concepts can be adopted as those currently applied in conventional photon and proton-beam therapy. They were defined in successive ICRU Reports for external beam therapy with photons [ICRU1993, ICRU 1999], electrons [ICRU 2004], protons [ICRU 2007] and IMRT [ICRU 2010] and ULICE Reports D-JRA 2.1 and 2.5 [ULICE 2011, ULICE 2012). Several volume concepts related to both tumour and normal tissues have been defined for use in treatment planning and reporting. They are used in beam optimisation for PTV delineation, for inverse planning which is common for IMRT, scanned proton and ion-beam therapy.

The different volumes relevant in radiation therapy can be presented in three groups: two groups are related to the "oncological target", the third one to normal tissues:

- general oncology-volume concepts
- radiation-therapy volume concepts
- normal tissue at risk volumes

The general oncological concepts include the gross tumour volume (GTV) and clinical target volume (CTV). The GTV and CTV are volumes with proven (GTV) or suspected (CTV) cancer involvement. Their definition and delineation are based on general clinical oncological principles and are thus independent from the treatment modality or strategy: surgery, radiation therapy, medical treatment. Delineation of the GTV and CTV should be influenced only by oncological considerations: it is thus irrelevant whether photons, electrons, protons, ions or any other radiation techniques are employed. It is important not to let the intended irradiation technique affect how the GTV and CTV volumes are delineated as one may wish to combine, compare or retrospectively analyze treatment plans for more than one treatment modality.

In the second group of volumes, when the CTV(s) to be treated by radiation therapy is (are) decided, the radiation-oncology volumes depend largely on technical aspects of the radiation techniques: planning target volume (PTV), internal target volume (ITV), treated/reference volume(s). The PTV concept has recently been introduced in surgery [Banse].

This approach is consistent with the growing tendency of combining the different diagnostic and therapeutic strategies and modalities (surgical, medical and radiation therapy) based on multidisciplinary disease and risk assessment. Secondly, for that goal, research, modern approaches and clinical developments are more and more applied in "comprehensive cancer centres". This is in particular the case today in ion-beam therapy. Actually, these approaches result in better clinical results [Kramer 1984]. As a third argument: the reasons of evolution and progress are different for both groups: on the one hand medical and diagnostic approaches for the oncological volume concepts, on the other hand technological and conceptual for the radiation-therapy volume concepts. However it is recognised that in medical sciences it is not always possible to define strict limits between different concepts, definitions and patient groups/staging. The final aim is to use a multidisciplinary approach to control the disease in the GTV and the overall CTV(s) (local, regional and distant spread) taking into account adverse side effects and impairment in quality of life.

Some common terminology and concepts have to be agreed upon for all the different treatment modalities within the organization of regular multidisciplinary tumour boards (e.g. , patient staging, joint decision making on treatment strategy, treatment monitoring, evaluation of outcome, etc). The

CTV concept has recently been introduced in surgery (neurosurgery). The terminology "surgical safety margin" around the GTV has been proposed [Banse].

The third group of volumes is related to the normal tissue tolerance, i.e., organs at risk (OAR), planning organ at risk volumes (PRV) and remaining volumes at risk (RVR).

In the modern comprehensive cancer centres, the GTV is delineated by a multidisciplinary team representing at least the following disciplines: surgery, radiation therapy, medical oncology, imaging (radiology, CT, MRI, etc), pathology and others if needed.

For the CTV, in addition organ specialists, epidemiologists, biologists and others if needed are added.

To define and delineate the radiation-oncology volumes and apply the selected treatment modality a close collaboration between the radiation-oncology and the medical physics teams is essential.

3.1.1 Imaging in 3D and 4D

3D imaging (and the specific input of modern 4D imaging), selection and delineation of the GTV, CTV and OAR are crucial steps in a chain starting with the decision to treat the patient with radiation therapy and ending with the response evaluation and the follow-up in search of recurrence and treatment-induced morbidity. Delineation of the CTV, PTV and OAR is a medical decision of the radiation oncologist, which results from a clinical judgment involving many factors.

All volumes should be related to and represent the patient's anatomy in treatment conditions. Movements or anatomical changes in the patient anatomy/morphology can be visualized by using a time series (four-dimensional) representation, *e.g.*, daily-repeated or respiration-correlated CT scans, where the fourth dimension (*i.e.* time) allows visualization of time-dependent changes in anatomy/morphology. Four-dimensional technology (4D) is increasingly used, in both diagnosis and therapy *e.g.* for lung tumour treatment. Future planning systems will be able to handle four-dimensional scans, *e.g.*, by displaying a cine loop on the monitor. In principle, this technology will make it possible to generate four-dimensional representations of a patient. The deformable image registration will delineate these volumes in individual time slices to enable anatomical dose-volume analysis.

3.2 General oncological volume concepts

3.2.1 Gross tumour volume(s), GTV

3.2.1.1 Definition

The Gross Tumour Volume (GTV) is the gross demonstrable extent and location of the tumour at diagnosis, before any treatment. It may consist of a primary tumour (primary tumour GTV or GTV-T), metastatic regional node(s) (nodal GTV or GTV-N), or distant metastasis (metastatic GTV, or GTV-M).

In case of post-operative irradiation after assumed complete surgical resection (R0 or R1 resection), there is no GTV to define, and only a CTV needs to be delineated. This comment also applies for the resection of metastatic regional nodes.

There are several reasons to describe and report the GTV in a complete and accurate way. Firstly, it is required for staging, *e.g.* according to the FIGO and/or the TNM system [AJCC 2010]. Secondly, an adequate dose must be delivered to all parts GTV to obtain tumour control. Thirdly, evaluation of the regression of the GTV and resulting alteration of the position of the normal tissues is needed for redefining the CTV and the PTV during the course of (a combined) treatment. Fourthly, changes of the GTV during treatment may be predictive of treatment outcome and thus analysed carefully.

When defining and reporting a GTV it is necessary to specify: the tumour location and extent (three dimensional) according to the TNM/AJCC [AJCC 2010) or UICC [UICC 2009] cancer-staging systems and the WHO International Code for disease in Oncology (ICD-O)[WHO 2000].

3.2.1.2 Variation in the delineation of the GTV due to pathology and observers bias

Although the concept of GTV itself is simple and straightforward, in clinical practice, accurate delineation of the GTV may be difficult for pathological reasons. In some cases there are no clear boundaries resulting in differences of appreciation [Leunens 1993]. Due to differences in tumour pathology/histology, growth pattern and anatomical spread, the delineation of the limits of the GTV may be difficult as clearly illustrated in figure 3.1 comparing a tumour clearly circumscribed and another one diffusely infiltrating.

Clinical and imaging interpretations of the observers may lead to some variability in the delineation of the GTV and as a consequence of the CTV(s) [ICRU 1999, Leunens 1993].

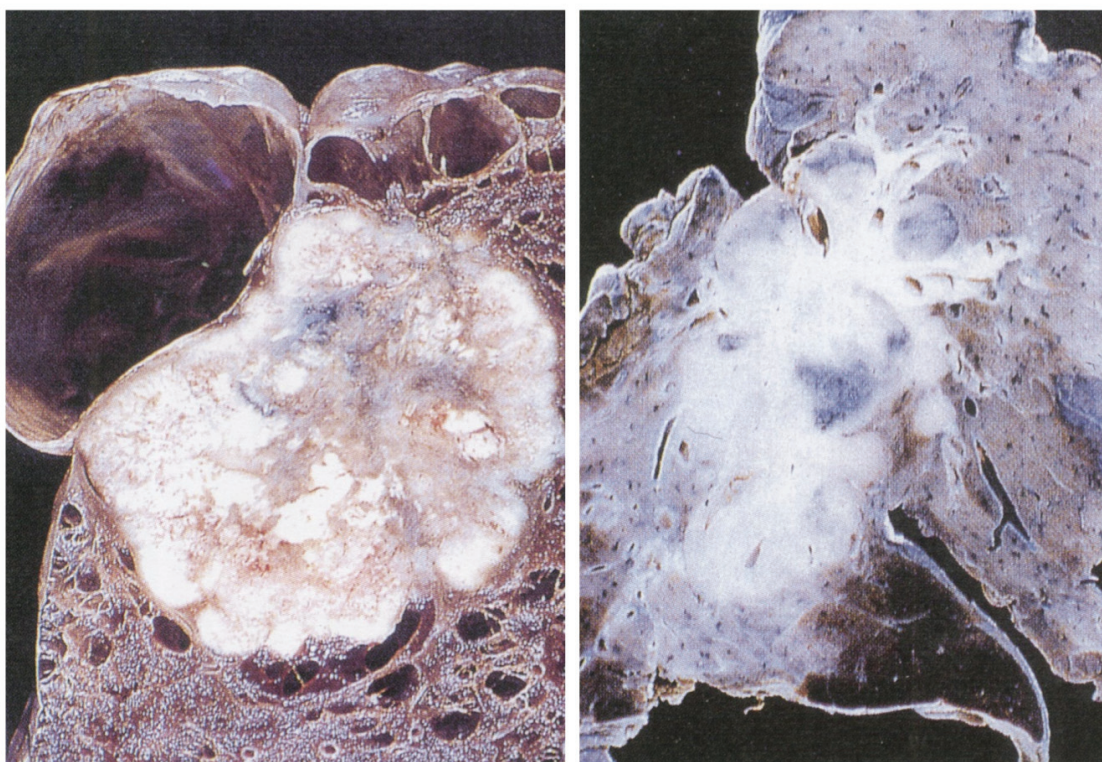


Figure 3.1. Example of two different macroscopic growth patterns for lung tumours. To the left a large-cell carcinoma, arising in the periphery of the lung. The tumour is well circumscribed. To the right a case of small-cell anaplastic lung cancer (SCLC), with an irregular tumour and invasion along the bronchial tree. (from Dana-Farber Cancer Institute, Atlas of Diagnostic Oncology, T.Skarin M.D.(Ed.), cited in [ICRU 1999].

3.2.1.3 Variation of GTV with anatomic and functional imaging technique

The methods used to delineate the GTV have to be specified and reported because different examination methods may lead to different results. (Fig 3.2 and Fig3.3)

3.2.1.4 Identification of functional sub-GTV(s)

For 3D-CRT and IMRT, until recently, anatomic imaging using CT and MRI scans were typically the most commonly used techniques to define the extent of the GTV, in addition to clinical examination.

More recently introduced, the use of functional imaging with positron emission tomography (PET) using various tracers or with functional MRI (fMRI) can add a functional aspect to the delineation of the GTV, e.g., metabolic status, hypoxia, cellular proliferation that are likely to impact on the treatment outcome (Table 3.1) [Grégoire 2009, Haubner, 2010].

From a therapeutic point of view, functional information can be used to define sub-GTVs that should receive some additional dose [Ling 2000]. It is thus important that the method used to evaluate the size and shape of the GTV be specified as different clinical and imaging methods may result in different delineated GTVs.

3.2.1.5 The composite GTV

If different methods for the definition of the GTV are used which provide complementary information, the radiation oncologist may have to define a "composite" GTV. This composite GTV (GTV_{compplan}) is the GTV that will be ultimately adopted for the oncological aspect of the treatment planning. The clinical and imaging methods used must be specified.

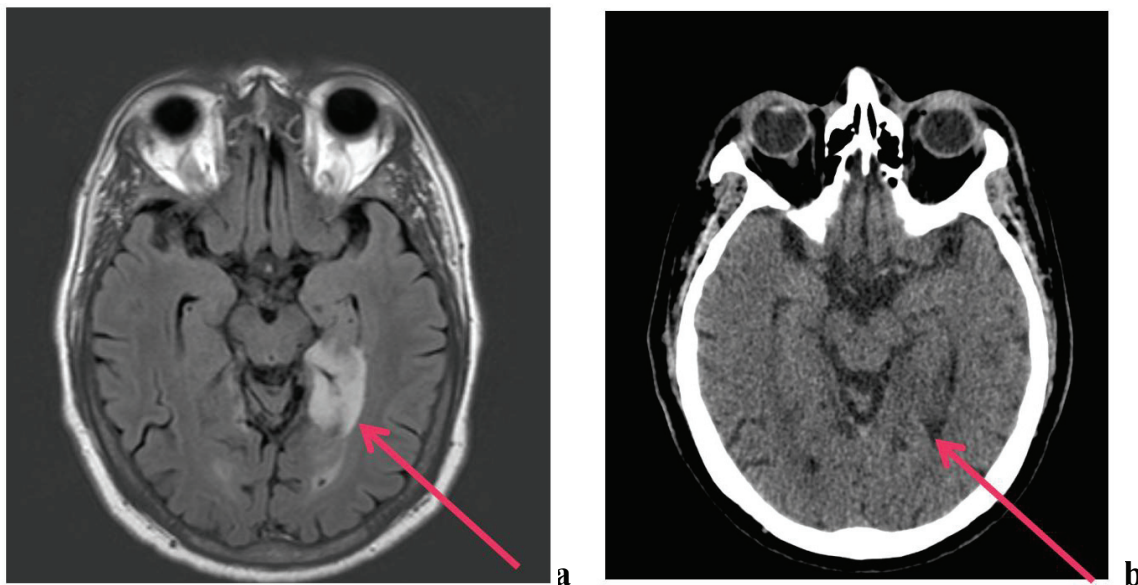


Fig 3.2. Low grade glioma located at the left internal deep temporal region (arrows). Clinically the initial symptom was epileptic strokes. No biopsy performed. The lesion can be more clearly delineated on the MRI section. Fig 5.2a (above): hypersignal clearly seen at the MRI-FLAIR sequence (FLuid Attenuated Inversion Recovery). Fig 5.2b (below): CT section without contrast-enhancing medium. (Courtesy: L.Renard, St-Luc Univ.Clinics, Brussels, Belgium)

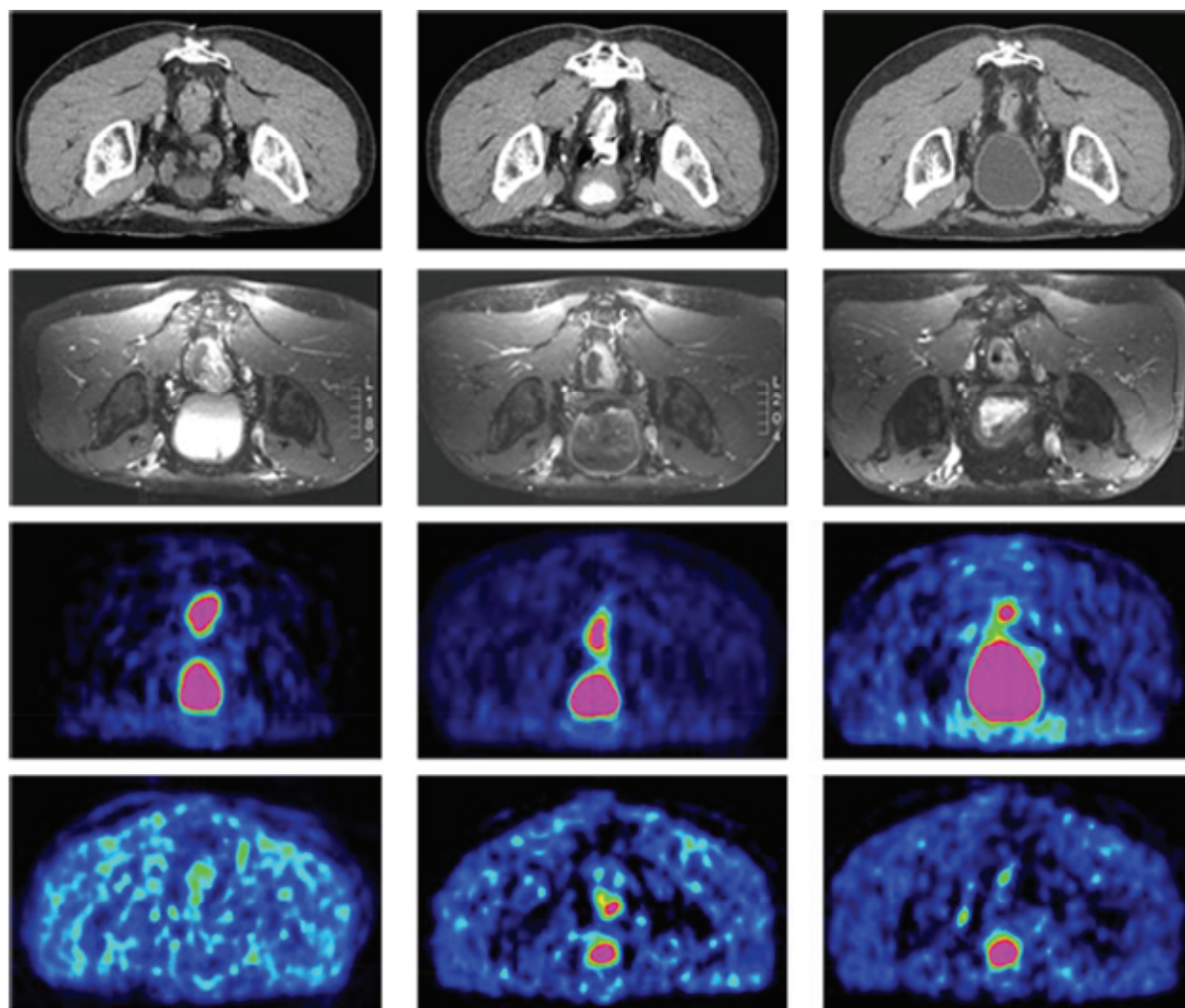


Figure 3.3: Comparison between various modalities for the definition of the primary rectal tumour GTV before, during concomitant chemo-radiotherapy (19 Gy) and after therapy (46 Gy). PET-CT acquisitions were performed in a prone position using a belly board; MRI acquisitions were performed in supine position. Courtesy of Prof. K. Haustermans, KULeuven, Belgium, cited in [ICRU 2010] page 44, figure 4.3.

Left column: GTV delineated prior any treatment.

- First row: primary-tumour GTV delineated with a contrast- enhanced CT: GTV-T (CT, 0 Gy).
- Second row: primary-tumour GTV delineated with a fat-saturated T1-weighted turbo spin-echo MRI: GTV-T (MRI T1, fat sat, 0 Gy).
- Third row: primary-tumour GTV delineated with a FDG-PET: GTV-T (FDG-PET, 0 Gy).
- Fourth row: primary-tumour GTV delineated with a F-Misonidazole PET: GTV-T (F-Miso-PET, 0 Gy).

Middle column: GTV delineated during treatment (average absorbed dose 19 Gy)

- First row: primary-tumour GTV delineated with a contrast-enhanced CT: GTV-T (CT, 19 Gy).
- Second row: primary-tumour GTV delineated with a fat-saturated T1-weighted turbo spin-echo MRI: GTV-T (MRI T1, fat sat, 19 Gy).
- Third row: primary-tumour GTV delineated with a FDG-PET: GTV-T (FDG -PET, 19 Gy).
- Fourth row: primary-tumour GTV delineated with a F-Misonidazole PET: GTV-T (F-Miso-PET, 19 Gy).

Right column: GTV evaluated 27 days after treatment.

- First row: primary-tumour GTV delineated with a contrast- enhanced CT: GTV-T (CT, 46 Gy).
- Second row: primary-tumour GTV delineated with a fat-saturated T1-weighted turbo spin-echo MRI: GTV-T (MRI T1, fat sat, 46 Gy).
- Third row: primary-tumour GTV delineated with a FDG-PET: GTV-T (FDG -PET, 46 Gy).
- Fourth row: primary-tumour GTV delineated with a F-Misonidazole PET: GTV-T (F-Miso-PET, 46 Gy).

Table 3.1: Tracers for image-guided radiotherapy using positron emission tomography. ¹¹C has a half-life of 20 minutes. ¹⁸F has a half-life of 118 minutes, ⁶⁴Cu has a half-life of 12.7 hours, and ⁶⁸Ga has a half-life of 67.7 minutes. From [Grégoire 2009, Haubner 2010]

Molecular uptake mechanism	Tracer	Isotope	Organs of highest physiological uptake ^a
amino acid transport and protein synthesis	Methionine	C-11	liver, salivary glands, lachrymal glands, bone marrow, pancreas, bowels, renal cortical, urinary, bladder
	Fluoroethyltyrosine	F-18	pancreas, kidneys, liver, heart, brain, colon, muscle
	FDOPA	F-18	pancreas, liver, duodenum, kidneys, gallbladder, biliary duct
glucose metabolism	FDG	F-18	brain, myocardium, breast, liver, spleen, stomach, intestine, kidney, urinary bladder, skeletal muscle, lymphatic tissue, bone marrow, salivary glands, thymus, uterus, ovaries, testicle, brown fat
proliferation hypoxia	FLT	F-18	bone marrow, intestine, kidneys, urinary bladder, liver
	FMISO	F-18	liver, urinary excretion
	FAZA	F-18	kidneys, gallbladder, liver, colon
	Cu-ATSM	Cu-64	liver, kidneys, spleen, gallbladder ^b
lipid metabolism	Choline	C-11	liver, pancreas, spleen, salivary glands, lachrymal glands, renal excretion, bone marrow, intestine
	Fluoroethylcholine	F-18	liver, kidneys, salivary glands, urinary bladder, bone marrow, spleen
	Acetate	C-11	gastrointestinal tract, prostate, bone marrow, kidneys, liver, spleen, pancreas
angiogenesis/integrin binding	Galacto-RGD	F-18	bladder, kidneys, spleen, liver
	AH11585	F-18	bladder, liver, intestine, kidneys
SSTR binding	DOTATOC	Ga-68	pituitary and adrenal glands, pancreas, spleen, urinary bladder, liver, thyroid
	DOTATATE	Ga-68	spleen, urinary bladder, liver

^a Uptake ranking is from higher to lower organ activity concentration

^b Estimated from calculations using ⁶⁰Cu-ATSM-PET.

3.2.1.6 Variations of GTV with time (4D): adaptive approach

The dimensions and shape of the GTV may change during treatment. These changes may be quantified with anatomic and/or functional imaging techniques, allowing the definition of a modified GTV that might be used to adjust the dose distribution for an adaptive approach (Geets et al., 2006; 2007b). It is therefore recommended to specify the dose already delivered and/or the time when the GTV is evaluated or measured with respect to the start of treatment.

If the GTV changes with treatment, i.e., "tumour shrinkage" different successive GTVs may have to be assessed: GTV_1 , GTV_2 , etc. For example, if external beam therapy is combined with simultaneous chemotherapy, the GTV should be evaluated at the successive stages of the treatment: GTV_{diag} , $GTV_{20Gy/2cisplat}$, $GTV_{45Gy/5cisplat}$, or GTV_{45Gy} . In addition to volume regression, special emphasis should be given to the changes in the various tumour characteristics: signal intensity (MRI), SUV (PET CT), configuration and topographic relations of the GTV to adjacent structures [Lim, 2009, van de Bunt 2006, van de Bunt 2008]

Noteworthy some topics, as the modification of the tumour size during treatment are of small interest for carbon ions since these are short treatments of usually slow growing and shrinking tumours.

3.2.1.7 Reporting the GTV

For reporting the GTV, the following parameters should be indicated:

- anatomical location, extent, volume and dimensions (three orthogonal dimensions).
- technique(s) used for evaluation.
- time when evaluation was made (in relation to the start of the treatment or absorbed dose delivered).
- information about functional subvolumes (if relevant).

Because delineation of a GTV may vary according to the diagnostic modality and as a result of the treatment, a clear notation is required. For example:

- GTV-T (clin, 0 Gy): tumour GTV evaluated clinically before the start of the radiotherapy;
- GTV-T (MRI-T2, 30 Gy): tumour GTV evaluated with a T2-weighted MRI scan after a dose of 30 Gy of external beam irradiation.

This approach avoids the introduction of new or potentially confusing terminology *e.g.* biological target volume, proliferative target volume, hypoxic target volume, and is able to cover all the different situations that might be encountered.

3.2.2 Clinical target volume (CTV)

3.2.2.1 Definition

The Clinical Target Volume (CTV) is a volume of tissue that contains a demonstrable GTV and the assumed subclinical malignant disease at a certain probability where therapy should be considered to achieve the treatment aim. Following complete surgical resection, the CTV may contain only sub-clinical disease.

The treatment aim is cure or palliation and always includes considerations in regard to treatment related adverse side effects and impairment in Quality of Life. The type of malignancy, the potential of combined treatment strategies, the consequence of loco-regional failure and the expected feasibility of salvage treatment need to be considered for defining the CTV especially the CTV planned for radiotherapy, and rely on the clinical judgment of the oncology team responsible for

the patient.

The notion of subclinical malignant disease takes into account:

- for radiotherapy and for surgery:
 - the microscopic tumour spread at the boundary of the primary tumour GTV (a kind of "shell" outside of what can be observed, palpated, or visualized on a particular imaging modality) i.e., CTV-T. This factor is particularly relevant in ion-beam therapy.
 - the possible regional infiltration into lymph nodes (CTV-N), and the microscopic tumour spread around a macroscopically involved node.
- for systemic treatment:
 - the potential metastatic involvement of other organs that needs also to be considered which may also include a certain site for radiotherapy (e.g., brain), despite their normal appearance on clinical and radiological examinations (CTV-M).

Definition of the CTV(s) is in principle the joint responsibility of the oncology teams involved in surgical, medical and radiation-treatment modalities. Definition of the CTV(s) to be treated by radiation-therapy is the responsibility of the radiation oncologist (team) in charge of the patient and the associated physics team. It is currently based on personal clinical experience, experience accumulated in the department, exchanged and published information and, increasingly, on consensus guidelines available from treatment atlases. It is an important step in the treatment prescription together with the selection of the dose levels expressed in terms of DVH and/or absorbed dose(s) to selected reference points.

For quantitative margin definition and future research, it would be advantageous to introduce a probabilistic definition, e.g., to choose the CTV based on a defined probability of containing clonogenic cells and on their concentration [ICRU 2010].

3.2.2.2 Delineation of the CTV

Delineation of the CTV The approach for the delineation of the CTV may be very different between highly malignant (aggressive) and slowly (moderately) infiltrating tumours (e.g., meningiomas). The selection of the tissues that bear risk for microscopic infiltration outside of the GTV is a probabilistic assessment integrating the biological and clinical behaviour of the various tumour entities, and the knowledge of the surrounding anatomy, including structures that are barriers to tissue infiltration (e.g., muscular fascia, bone cortex), or on the contrary, by structures that are easy conduits for tumour dissemination (e.g., fatty space) (Fig. 3.4).

Different tumours can exhibit a variety of spread patterns. For instance, the vast majority of sarcomas do not bear risk of lymph-node infiltration, and if surgery is performed the post-operative CTV will typically include only the post-operative tumour bed based on the principle of "fascia containment" [O'Sullivan 2003]. In head and neck squamous-cell carcinomas, the probability of pathologic lymph node involvement has been well described, and the distribution follows a predictable pattern allowing clinicians to tailor the CTV based on the primary tumour location and extent [Grégoire *et al.*, 2006]. Similar observations have been reported for other tumour types and sites as well (e.g., for rectal tumour see Table 3.2).

At the primary tumour site, the selection of CTV should be guided by the general principle that the microscopic spread of tumour cells follows anatomical compartments (e.g., in the head and neck area, para-laryngeal, para-pharyngeal, pre-epiglottic spaces) limited by anatomical barriers (e.g. bone cortex, muscular fascia, ligaments). Unless transgressed, such barriers would limit the local primary tumour spread. Over the last few years, recommendations for CTV selection have been proposed for various primary tumour sites. The three-dimensional delineation of the CTV for both the primary tumour or nodal site should be guided by published recommendations, which aim to

translate the regions at risk for microscopic dissemination (both around the primary tumour and at lymph node areas) into borders easily identifiable on the planning CT or MRI scans, see reviews in [Grégoire 2003].

By definition, each malignant tumour GTV should be associated with a CTV. However, several contiguous GTVs could be associated into a common CTV. A typical example is multiple contiguous metastatic nodes at levels II and III in the neck, which are associated with a single CTV covering the whole of levels II and III. When sub-GTVs are delineated, for example, by a GTV-T (F-Miso-PET) to detect hypoxia, the whole anatomic GTV, for example, a GTV-T (CT), is typically surrounded by a common CTV.

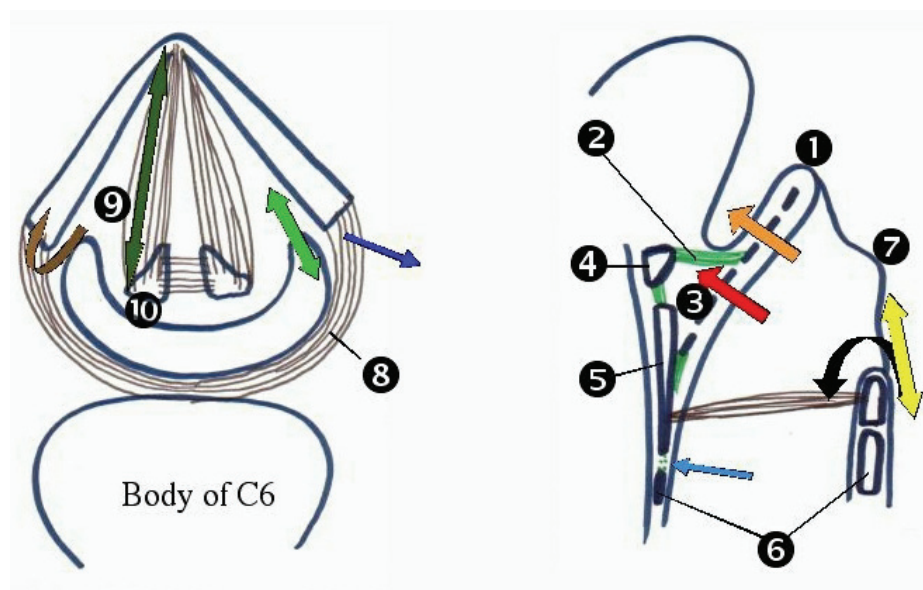


Figure 3.4. Schematic view of laryngeal/hypopharyngeal tumour infiltration. Axial view at the level of the vocal cord (left panel) and mid-sagittal view of the pharyngo-larynx (right panel). Tumours of the supra-glottis larynx easily infiltrate the pre-epiglottic space (3) through the infra-hyoid epiglottis (1) (red arrow). The hyo (4) - epiglottis membrane (2) prevents tumour infiltration to the valleculae. Tumours of the supra-hyoid epiglottis easily infiltrate the valleculae through the epiglottis (orange arrow). Glottic tumours can infiltrate the thyroid cartilage (5) and the arytenoid cartilage (10) at the insertion of the vocal muscle (dark green arrow). Anteriorly, glottic tumours can invade the anterior commissure, and from there infiltrate outside of the laryngeal box through the crico (6)- thyroid membrane (light blue arrow). Tumours of the hypopharynx can directly invade the para-glottic space (9) (light green arrow), the thyroid cartilage (5) (brown arrow), the parapharyngeal space through the constrictor muscle (8) (dark blue arrow), and the endolarynx through the ary-epiglottic fold (7) (black arrow) [IAEA-ICRU, 2008].

Table 3.2. Selection of the CTV for rectal carcinoma according to T-N stage

TN stage	Organ or site of adherence or invasion	Tumour or tumour bed volumes	Nodal volumes
T1-3N1-2	Not applicable	Rectum / rectal bed ^b	Internal iliac, pre-sacral
T4N0	Anterior or posterior	Rectum / rectal bed plus organ / structure involved	Internal iliac, pre-sacral; optional: external / common iliac if anterior adherence
T4N1-2 (anterior adherence or invasion)	Prostate, bladder, uterus, vagina (proximal 2/3) ^a	Rectum / rectal bed plus organ/structure involved	Internal iliac, pre-sacral, External / common iliac a
T4N1-2 (posterior / lateral adherence or invasion)	Presacrum or pelvic side-walls	Rectum / rectal bed plus organ / structure involved	Internal iliac, pre-sacral

Redrawn from Gunderson in [Grégoire 2003]

^a inguinal nodes should be included if distal vagina or anus is involved by direct extension of primary or recurrent tumour

^b Primary tumour plus 3 - 5 cm margin

3.2.2.3 Risk-related CTV

The probability of presence of malignant cells and their density in the safety margin around the GTV decreases with the distance from the border of the GTV. The malignant cell density is the highest at the border of the GTV and is expected to decrease (in principle) down to zero at the external border of the CTV (i.e., external border of the safety margin). Therefore and because of the related risk of recurrence, the concept of risk related-CTVs has been introduced in cervix brachytherapy [ICRU-GEC-ESTRO] and today adopted in ion-beam therapy [ULICE 2012].

In that respect, high-risk CTV (HR-CTV) and low-risk CTV (LR-CTV) can be identified. One practical consequence is that different techniques and dose levels may be prescribed to high and low-risk CTVs.

The assessment of risk may be based on the assumed probability of cancer involvement and cell density at the beginning of the treatment but also on the response to treatment (see below "adaptive" concept). This approach has been used e.g., in Hodgkin's disease, small cell-lung cancer, anal cancer and head and neck cancer since long with applying a boost treatment to residual macroscopic GTV.

3.2.2.4 Adaptive concept for CTV assessment

It is well documented that the GTV - as can be observed with different clinical investigations and imaging techniques - changes (is shrinking) during the course of the treatment. It is thus important when reporting the dimensions and shape on the GTV to specify the delivered treatment dose or the time when the GTV volume/extent is delineated.

In contrast the CTV is a "subclinical" concept, based on the probability of cancer cell invasion. As a consequence by definition the CTV cannot be detected clinically (palpation) or by any "macroscopic" imaging technique (e.g. CT, MRI).

However the CTV is related to a GTV. Any (rate of) regression of the GTV during treatment may influence the delineation of the corresponding CTV (e.g., thickness of the safety margin). In

addition, during the treatment course with the regression of the GTV and/or patient loss of weight, the anatomical structures (muscles and others) may be altered requiring a new delineation of the CTV.

The CTV should be adapted to the response of the GTV to the initial part of the treatment, assessed by clinical examination, anatomic or functional imaging. Functional imaging may be the basis for the evaluation of the responses of the sub-GTVs that could imply a modification or an additional treatment, which emphasises the importance of the 4D follow-ups.

3.2.2.5 Reporting the CTV

Following parameters should be reported:

- The anatomical location, extent, volume and dimensions (three orthogonal dimensions).
- Specification of the corresponding GTV (if applicable)
- Identification of high and low risk CTV(s) (if relevant)
- The time when evaluation was made (in relation to the start of the treatment or absorbed dose delivered).

When several CTVs are used, it is recommended that an unambiguous terminology corresponding to the GTV denomination be used. This is especially true for ion-beam therapy when ion beams are used as a boost after a larger PTV treated with photons. For example:

- CTV-T (0 Gy) corresponds to the CTV including the primary tumour GTV and assumed regions of infiltration as defined before the start of the treatment;
- CTV-T+N (MRI-T2, 30 Gy) corresponds to the CTV for the primary tumour and regional nodes evaluated with a T2-weighted MRI scan after a dose of 30 Gy.

The CTV does not describe the range of motion of internal anatomy. Knowledge about the CTV motion (and all other geometrical uncertainties) are taken into account in the PTV delineation

3.3 Radiation therapy volume concepts

3.3.1 Introduction

In the previous sections, general oncological concepts were considered as applicable to any kind of cancer treatment strategy using surgery, radiation therapy and/or medical/chemotherapy. The different modalities may be applied simultaneously and/or successively: the tumour response or tolerance to one treatment modality may influence the selection and parameters of the following treatment modality.

The present section deals with concepts related to radiation oncology. The global treatment prescription includes the place of radiotherapy within the multimodality cancer strategy, i.e. surgery, radical/(neo-)adjuvant, simultaneous/successive anti-neoplastic drugs. The prescription of radiotherapy implies the definition of all CTVs that should be irradiated, their extent and location, the dose (and dose distribution) and fractionation.

3.3.2 The Planning Target Volume, PTV

3.3.2.1 Definition

The PTV is a geometrical concept introduced for treatment planning, dose prescription, dose-volume reporting and evaluation. For external beam therapy it is the recommended tool to shape dose distributions to ensure that the goal of the radiation treatment will actually be reached despite geometrical uncertainties such as organ motion and setup variations [ICRU 2007].

The goal of the radiation-therapy contribution to the cancer treatment is to deliver the prescribed dose to every CTV selected for radiation therapy. To achieve this goal, the concept of the Planning

Target Volume (PTV) has been introduced initially for external photon-beam therapy [ICRU 1993]. It was developed and slightly adapted to be applicable to the other external beam techniques in successive ICRU Reports [ICRU 1999, ICRU 2004, ICRU 2007, ICRU 2010].

The PTV is defined as the volume planned to be irradiated at the appropriate dose in order to ensure that all parts of the CTV receive the prescribed dose with a clinically accepted probability. It includes the CTV and a margin that accounts for organ motion and geometrical uncertainties in dose delivery. The PTV may be larger (much or slightly) or even equal to the CTV. The dose level appropriate to delineate the PTV depends on the irradiation technique; it is in general slightly lower than the dose prescribed to the CTV.

Besides uncertainties when delineating the PTV, it should be stressed that uncertainties already exist at the level of the delineated CTV; their importance largely depends on the tumour location and clinical situation. It is a clinical/oncological issue which requires the judgment/expertise of the radiation oncologist in charge.

The PTV should be reported in such a way that one could reproduce exactly the treatment technique. The report should include the specification of the corresponding CTV (and GTV if relevant). A PTV is to be defined each time radiotherapy of a CTV is planned for curative, postoperative or palliative intent. However, depending on the technique, the approach to delineate the PTV, its size and shape may be very different. Unlike the volume concepts for GTV and CTV, the PTV depends, to a large extent, on the treatment conditions and the possibilities or limitations of the radiotherapy techniques. Depending on the global treatment strategy there can be one or several PTVs irradiated simultaneously or successively.

The additional volume irradiated when adding a PTV margin to a CTV depends, on the tumour location and treatment technique. In some cases, such margins may be small, e.g., in high-precision radiation-beam techniques (IMRT, stereotactic treatments, protons or ions, etc.) or in techniques where the radiation applicator is fixed to the target, as in intracavitary/interstitial brachytherapy.

3.3.2.2 Delineation of the PTV

Clinical delineation of the PTV implies two types of uncertainties:

1. Movements (physiological), changes in size and shape and position of the CTV within the patient (they could influence the surrounding normal tissues and OARs). To take into account this first set of uncertainties, *the internal margin* is added to the CTV. To a limited degree, these uncertainties can be reduced by better preparation and clear instruction to the patient.

In external beam therapy the internal margin surrounds the CTV like a shell: it defines the Internal Target Volume (ITV).

The ITV was introduced in several ICRU reports in external photon-beam therapy [ICRU 1999 and ICRU 2004], although its current use was not strictly recommended in all reports. Because the ITV is defined mainly on physiological/medical bases it is rather similar for all irradiation techniques.

The importance of the 4D approach to follow the movements, changes in size and shape, and position of the CTV is obvious.

2. Uncertainties in target-beam positioning. The second set of uncertainties ("set up") related to the beam delivery conditions leads to the definition of the "external margin". The *set-up margin* is planned to compensate for these uncertainties. In contrast to the uncertainties on ITV, uncertainties on target-beam positioning are specific to the irradiation techniques and largely related to the technical constraints. In principle, special beam qualities (e.g., protons,

carbon ions) and accurate delivery techniques (e.g., IMRT) are intended to reduce these uncertainties. Different techniques thus result in different PTV delineation.

Combination of the internal and set-up margins to take into account these two types of uncertainties (CTV motion and target-beam positioning, respectively) forms the planning target volume (PTV). The ITV concept may be useful mainly in clinical situations where uncertainty about the position or movement of the CTV dominates over set-up uncertainties and/or when they are independent. Delineation of the ITV can thus be considered as an intermediate step from the CTV to the PTV.

In ICRU Report 62, it was recommended that for external beam radiotherapy internal and set-up margins should be added quadratically because the two sources of uncertainties are independent, [ICRU 1999]. More generally this allows adding any kind of independent uncertainties whatever their origins.

A unique PTV is defined for a CTV treated by a single type of irradiation technique. However when different types of radiations are applied, multiple PTVs need to be defined for the same CTV, e.g., IMRT combined with (one or more) beams of ions.

3.3.2.3 Specific issues when delineating the PTV in particle-beam therapy

The definition of the PTV and mainly its clinical application (delineation and reporting) raises issues that are specific to particle-beam therapy. Two types of set-up uncertainties have to be taken into account: those related to the beam-CTV positioning and those related to particle range. They could theoretically be added resulting in a kind of combined shell around the CTV. However their computation may raise difficulties related to algorithms abilities as mentioned in ICRU 78 [ICRU 2007].

On the one hand, for a given beam the set-up margin perpendicular to the beam axis depends on the accuracy in beam positioning/orientation and patient immobilization precautions. On the other hand, the set-up margin along the beam axis depends on the accuracy in beam penetration (related e.g. to heterogeneities in the tissues traversed).

When two (or more) non-parallel opposed particle beams are applied, delineation of the (unique) PTV would imply combination of two types of uncertainties and raise complex computation issues (algorithms). Therefore for the time being it has been recommended to report separately the PTV for each beam [ICRU-IAEA 2007].

In the particular case of the GTV (of high tissue density) which moves in the lung, the tissues behind the GTV may receive variable higher or lower doses as a result of these movements. This shadowing needs to be considered in the beam design to avoid over- or under-dosage, essentially allowing a margin for tumours (PTV) or normal tissues (PRV).

The interplay effect and range uncertainties

If scanning or highly segmented beams are used to treat moving tumours, tumour cells within the CTV may receive higher or lower doses. This uncertainty and its management require corrections for tumour motion and repainting (frequency of scanning) and strongly justify the use of 4D approach.

Changes in the range of every pencil beam, mainly in presence of complex inhomogeneities and possible interplay effects must be taken into account, especially for moving organs. The motion of the PTV changes its relative position relative to the pencil beams. The result is a deteriorated dose distribution. With an intestinal crypt cell assay, it has been shown in mice that with a scanning proton beam, movement of the small intestine in relation to the (rather slow) movement of the pencil beam could result in regions of the intestine being significantly under or over irradiated [Gueulette 2005].

Lomax studied the impact of inter-field motion with a scanned proton beam. For a 5 mm shift of the dose distribution, he reported considerable under-dosage (up to 20%) within the PTV [Lomax 2008]. The first simulation studies for patient geometries were performed by Bert and confirmed the risk of under-dosage reported in several studies

3.3.2.4 Reporting the PTV

The PTV should be reported in such a way that the treatment could be reproduced exactly elsewhere. Reporting should include the specification of the corresponding CTV (and GTV if relevant).

3.3.2.5 The PTV in surgery

The PTV concept may be applied in surgery in a similar way as was introduced in radiation therapy. In radiation oncology, the PTV is defined as the volume planned to be irradiated at the appropriate dose in order to ensure that all parts of the CTV receive the prescribed dose with a clinically accepted probability. It should be stressed that uncertainties already exist at the level of the delineation of the CTV; their importance largely depends on the tumour location and clinical situation. The CTV is a clinical/oncological issue which requires the judgment/expertise of the radiation oncologist (team) in charge of the patient [Banse].

3.4 Normal tissue related volume concepts

3.4.1 Introduction into treatment related morbidity and Quality of Life in oncology

Treatment related morbidity and associated impairment in quality of life are essential issues to be taken into account in cancer treatment and relate to any treatment modality alone, e.g., surgery, radiotherapy, or anti-neoplastic/targeted drug treatment or any combination of them. There are typical patterns of early and/or late morbidity associated with any of these treatment modalities. These may interact and can be increased when combining these modalities

Hence, the decision on a treatment strategy must be based on balancing the curative potential of each modality and the probability of inducing early or late adverse side effects, based on the available evidence.

3.4.2 Organs at Risk (OARs)

The organs at risk (OAR) or critical normal structures are tissues, which if irradiated could suffer significant morbidity, and thus do influence the treatment planning and/or the dose prescription [ICRU 2010]. In principle, all non-target tissues could be considered organs at risk, if they have impact on treatment and outcome. However, normal tissues considered as OARs typically depend on the location of the CTV/PTV and/or the prescribed dose.

It will be essential for future clinical research and practice to define and differentiate the different biological targets (volumes/points) for different functional and/or morphological endpoints and their associations with the dose-volume relations. Clinicians are encouraged to use systematically common grading scales for this assessment. This is important when different radiotherapy techniques (3D photons, IMRT, ions) are combined with their different targets and dose distributions.

The appropriate dose-volume constraints in the OAR will evolve further with time based on clinical research and based on further understanding of underlying biological mechanisms through experimental research. Such progress will be associated with the development of experimental, (bio-) imaging and treatment techniques.

3.4.3 Planning Organ at Risk Volumes (PRV)

For external beam therapy, the concept of the Planning organ at Risk Volume (PRV) has been developed [ICRU 1998, ICRU 2004, ICRU 2007, ICRU 2010] which implies shell margins that have to be added to the OARs to compensate for variations and uncertainties, using similar principles as for the PTV. A margin around an OAR with a serial-like structure (e.g., spinal cord, neurological structure, *rectum* where the maximum dose to a small circumferential volume determines tolerance) is more clinically relevant than around OARs with parallel-like structure (e.g. liver, lung, parotid). For organs with parallel-like structure, it is more important to delineate the whole organ, since tolerance depends more on the percent of the whole organ volume irradiated as provided by DVHs.

For reporting external-beam radiation-therapy OAR dose, ICRU report 83 recommended that, similar to the PTV, the PRV be described by including the size of the margins applied to the Organ at Risk in different directions. As for the PTV, several authors have proposed approaches to calculate the OAR-PRV margins on the basis of systematic and random uncertainties [ICRU 2010].

A margin concept for OAR dose assessment has been implemented at specific organ sites, e.g. the spinal cord in head and neck radiotherapy. In particle therapy (see below), range uncertainties may require a PRV margin or similar constraints around sensitive "serial" tissues, e.g., spinal cord.

3.4.4 Remaining volume at risk (RVR) and OARs

The volume that is within the imaged region of the patient, but outside all delineated OARs and CTVs should be identified as the "remaining volume" at risk (RVR) [ICRU 2010]. Doses to the RVR should be reported in addition to the doses to specifically delineated volumes of interest (VOI) in order to ensure that attention is paid to all tissues, and not just a selected subset of them. There could be for example unsuspected regions of high dose within the patient that would go undetected if RVRs were not explicitly evaluated, particularly if IMRT is used. In addition, the dose to the RVR can be useful in estimating the risk of late effects such as carcinogenesis, which would have to be specified for various structures.

4 Approach for dose specification: reference points and/or DVH

4.1 Introduction

A useful exchange of medical and technical information implies that the approach adopted to specify doses and dose distributions would be the harmonised. Our irradiation techniques are not so perfect that the dose distributions in the volumes of interest are ever exactly what they should have been (even for the identified GTV subvolumes). Therefore some dose value(s) at reference points or alternatively some dose levels derived from dose-volume histograms (DVH) have to be selected for prescribing and reporting. The ICRU has been involved since decades in this issue: the first Report was published in 1979 [ICRU 1979].

Selection of relevant reference points for reporting dose was recommended in a first series of ICRU reports [ICRU 1993, ICRU 1999, ICRU 2004]. Recently the ICRU recommended to specify the doses to volumes expressed using the Dose-Volume-Histogram (DVH) concept. In particular D50, D98 and D02 values on the DVH curves have been recommended. Actually, D50 stands for the volume of interest that receives at least 50% of the prescribed dose [ICRU 2007, ICRU 2011, ICRU 2012].

4.2 Selection of reference points for prescribing and reporting

The reference point (ICRU Reference Point) should be selected according to the following general criteria:

- (a) the dose at the point should be clinically relevant and representative of the dose distribution in the PTV;
- (b) the point should be easy to define in a clear and unambiguous way;
- (c) the point should be in a region where there is no steep dose gradient;
- (d) the point should be selected where the dose can be accurately determined (physical accuracy).

These recommendations will be in general fulfilled if the reference point is located:

- first at the geometric centre (or in the central part) of the PTV ,
- secondly when relevant (photon beam therapy) at the intersection of the beam axes. Often, particle beam therapy uses combination of beams that have no or not relevant intersection of their axes (e.g. the patch technique in protontherapy).

There are of course situation where these conditions cannot be fulfilled (they are discussed in detail in ICRU Reports 50 [ICRU 1993] and 62 [ICRU 1999]) and other more relevant points/criteria need to be selected for individual patients. For example, the presence of shielding blocks, steep dose gradients or other dose heterogeneities could influence the selection of the reference point for reporting.

At the time when this approach was proposed the radiation oncologists tended to select in general the irradiation conditions with the goal of achieving a homogeneous dose distribution within the PTV (+7% and -5%). Because a certain degree of inhomogeneity of the absorbed dose throughout the PTV could not be avoided, it was recommended to report in addition to the dose at the ICRU Reference Point, the best possible estimation of the maximum and the minimum dose to the PTV [ICRU 1999, ICRU 2004]. A set of three dose values was thus recommended.

As shown as an example in the Fig. 4.1, these recommendations were suitable and found to be useful for many years especially for comparing the clinical data. They have shown their clinical relevance

When these recommendations were first published (2D reporting), it was not possible for technical reasons to report dose-volumes histograms, DVH (on a routine clinical basis). However when computation of DVH (3D reporting) became progressively available, the ICRU always recommended to report the available DVH for the volumes of interest together with doses at reference points.

In addition to reporting doses at the PTV, reference points for reporting dose to some OAR are used since many years e.g., rectum and bladder ICRU reference points in cervix brachytherapy [ICRU-GEC-ESTRO].

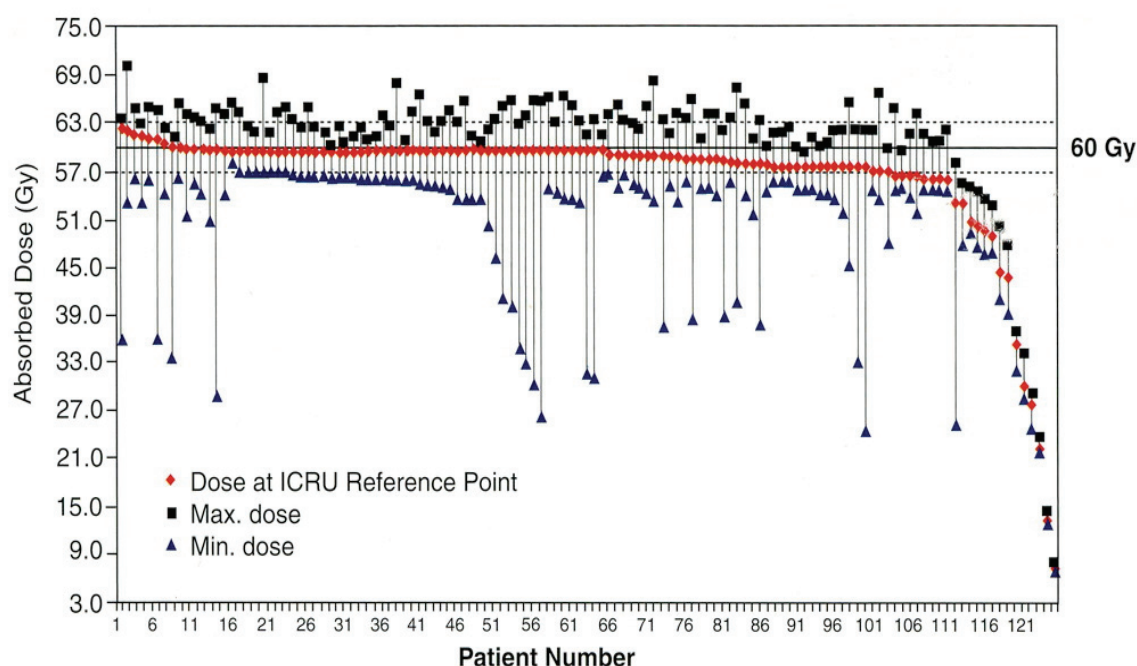


Figure 4.1: Multicentre (7 centres), randomised trial for a non-small-cell lung cancer, stage III, performed in Lund-Sweden. The prescribed dose (ordinate) was 60 Gy (+/- 5 percent) at the ICRU (central) reference point. A total of 125 patients (displayed in the abscissa) were included in the study: 82 % of them comply with the prescription (in red). There was a less satisfactory situation with the maximum dose (in black). The minimum dose (in blue) was within the accepted deviation in only 24 percent of the cases [ICRU 2004].

4.3 Dose-volume histograms (DVH) and selection of dose values on the DVH curve for prescribing and reporting

The ICRU has recently recommended specifying the dose to the PTV based on the DVH curve. In particular reporting D50, D98 and D02 dose levels (see definition later in this section) on that curve has been recommended [ICRU 2007, ICRU 2011].

The Dose-Volume-Histogram (DVH) represents the volume that receives at least a certain dose plotted against absorbed dose. In practice, the DVH is currently displayed as cumulative. In ordinate, the volume is expressed in cm³ (absolute term) and or in percentage of the volume of interest (relative term). In abscissa, the absorbed dose is expressed in absolute values (Gy) or as a percentage (e.g. of the prescribed dose) (Fig 4.2). Although in principle, any dose value on the DVH curve can be reported, in order to facilitate exchange of information, the recent ICRU reports (ICRU 2007, 2011) recommend the following values:

- the median dose D50: 50% of the volume received at least this dose

- the near minimum dose D_{98} : 98 % of the volume of interest (e.g. GTV, CTV, PTV or any OAR) received at least this dose.
- the near maximum dose D_{02} : the highest dose received by 2 % of the volume of interest.

As an example, Fig. 4.3 and 4.4 show the dose distributions obtained for a proton treatment of a chordoma of the skull base. It illustrates the amount of information that can be displayed based on the DVHs and corresponding to the target volumes and the surrounding critical normal structures. This impressive amount of clinically useful information is much larger compared to the report of only the dose to some (reference) points.

However, one limitation of the DVH approach is that there is no relation to a specified geometric coordinate system. Actually today, different radiation techniques are increasingly combined (e.g., proton and ion beams are often used as a "boost" after photon beam therapy; for cervix, external beam combined with brachytherapy is the standard treatment). One cannot combine (add) the doses if they are not related to common anatomical reference points or coordinate systems (i.e. the patient, the treatment head, the room).

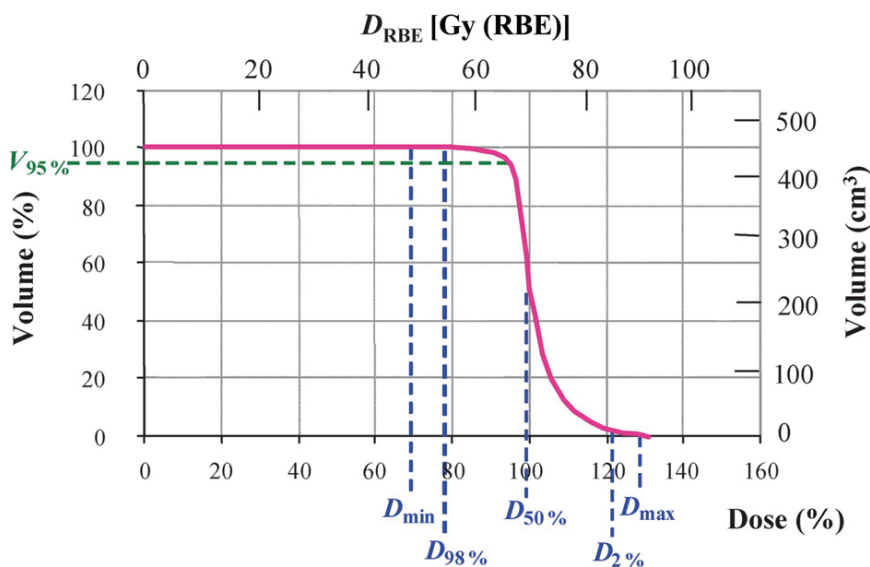


Figure 4.2: A typical dose–volume histogram display, illustrating the use of dual axes (relative and absolute values) for both the dose and volume dimensions, and how a number of volume and dose statistics can be read off from a DVH. $D_{50\%}$ is identical to D_{median} , and D_{min} ($D_{98\%}$) and D_{max} ($D_{02\%}$) are very close to $D_{100\%}$ and $D_{0\%}$, respectively.

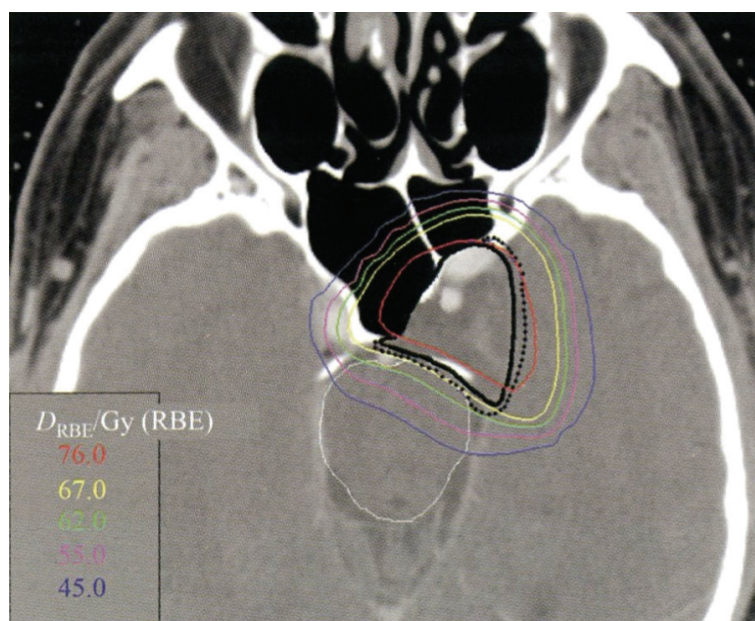


Figure 4.3: Isodose contours for the treatment of a chordoma of the base of skull using proton beams in the axial plane. The GTV and CTV are represented by solid black and dotted black lines, respectively [ICRU 2007].

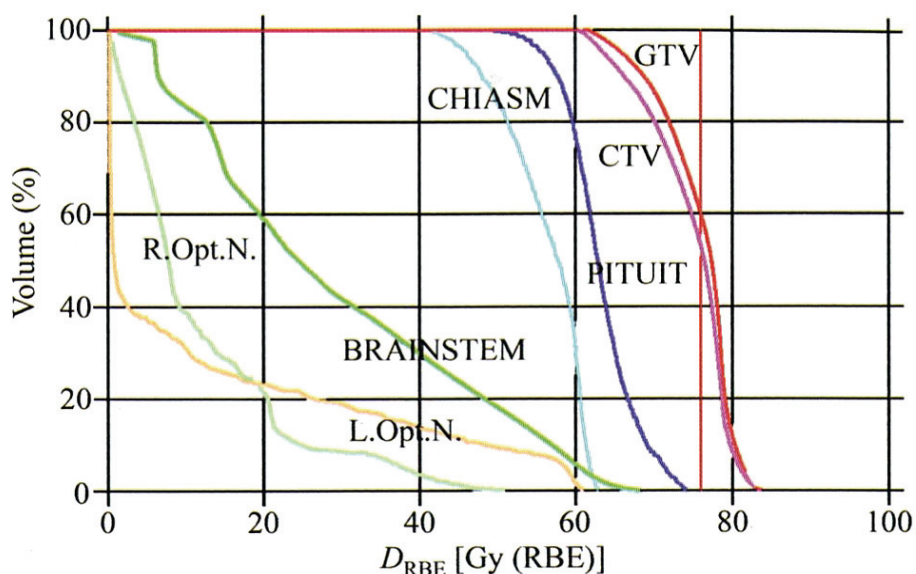


Figure 4.4: DVHs of GTV, CTV and five normal structures for the same patient described in Fig.4.3 [ICRU 2007].

4.4 Two approaches for prescribing and reporting: using reference points and/or DVH

The two approaches for prescribing and reporting using reference points or DVH are presented in sections 4.2 and 4.3, respectively. Reference points were used first at a time when DVH could not be used yet, and historically, a large amount of data were published. However, with some techniques the use of reference points which are in agreement with the criteria described in section 4.2 is not possible. As a typical example, in brachytherapy, the dose is sharply decreasing with the

distance from the sources and there is no plateau region for selecting a reference point. The same is true in some scanning beam applications with heavy ions as carbon-ion therapy.

Another approach - the use of the cumulative dose-volume histograms (DVH) - has been introduced and increasingly applied. Several arguments support this change in orientation and the use of DVH which is actually a statistical representation of the dose distributions of the treatment:

1. The dose distributions in volumes are more clinically relevant than doses to points. As an example, figures 4.3.2 & 4.3.3 show the dose distributions obtained for a proton treatment of a chordoma of the skull base. It illustrates the amount of clinically useful information that can be displayed based on the DVHs and corresponding to the target volumes and the surrounding critical normal structures.
2. In some clinical situations the radiation oncologist does not intend to deliver a homogeneous dose in some volumes. For example, sub-GTV(s) are identified within the GTV such as hypoxic zones, high proliferation zones, etc. This could imply a dose modulation of the prescribed dose to the PTV and the doses prescribed to the sub-PTVs may be different.
3. Today, the development of modern treatment planning and delivery techniques allow dealing routinely with doses in 3D (even 4D) volumes and the use of DVH. This was not possible previously.

The data published using the two approaches described above are in practice closer to each other than sometimes claimed: on the one hand the set of three dose values recommended in the first series of ICRU Reports i.e., the dose at ICRU Reference point, the minimum and maximum dose and on the other hand the three dose values (D98, D50, D02) recommended on the DVH curve [ICRU 2011]. The D50 is in general close to the traditional ICRU reference point. Actually they both are related on the same clinical approach: selection of a dose value that is representative of the dose to the CTV/PTV. The near minimum D98 is close to the minimum dose (i.e., actually D100). As far as the maximum doses are concerned, the near maximum dose D02 is expressed as a percentage of the volume represented on the DVH curve. The maximum dose as formerly defined in the ICRU report took into account the actual dimensions of the volumes of interest ($\emptyset = 15$ or 5 mm) depending on the location and the types of OARs. The risk of confusion may appear when modifying the method of reporting as illustrated on Fig. 4.5.

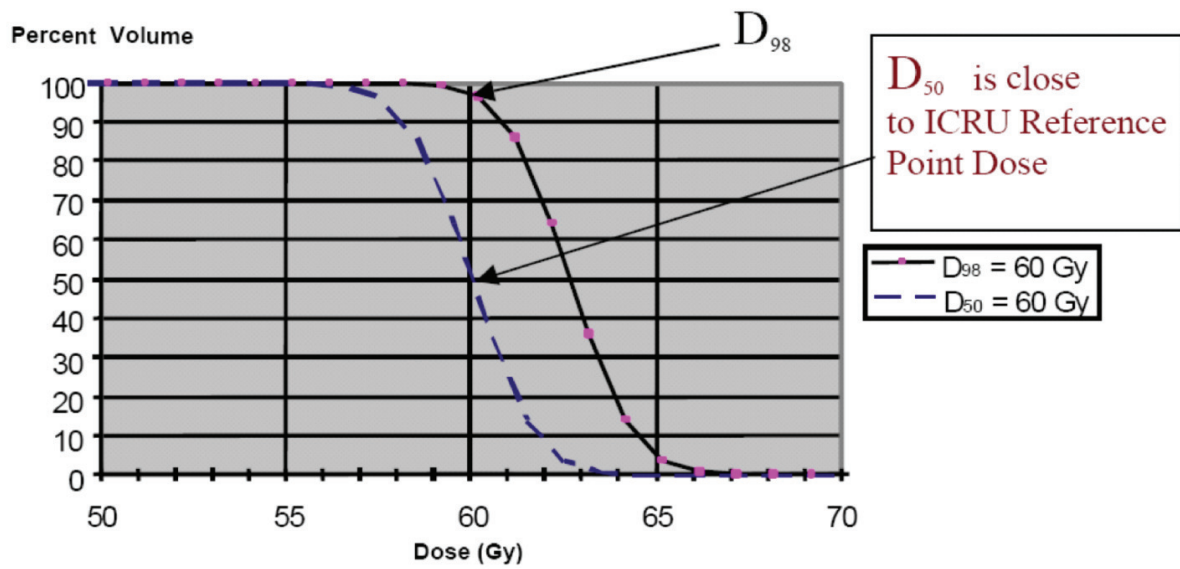


Figure 4.5: This figure illustrates the risk of confusion when modifying the method of reporting. The same dose of 60 Gy prescribed and reported to D_{50} or D_{98} may result in significantly different doses to the patient (adapted from [ICRU 2007]). On the other hand prescribing the dose to the (traditional) ICRU reference point or to D_{50} corresponds to a similar clinical approach (see text) but may result in an actually systematic difference in dose ($\pm 5\%$) that should be taken into account when comparing different (historical) patient series.

5 Relative Biological Effectiveness (RBE) and other relevant biological factors

5.1 Radiation quality: the LET and microdosimetric approach

Radiation quality is defined by the type, energy and directional spectra of the ionizing particles at the point of interest. For equal absorbed doses, different radiation qualities may produce different biological effects. Radiation quality can be approached by computation of LET spectra (Linear Energy Transfer, LET) or physical measurement (microdosimetry).

Different from the radiation quality, the beam quality defines the (macroscopic) characteristics of the beam by specifying parameters such as depth dose, homogeneity and penumbra.

The concept of LET was introduced when it became evident that the biological effects of the irradiation depend not only on the total absorbed dose but also on the density of the energy released by the particles along their path. LET most recent definition is given in ICRU report 69 [ICRU 1998].

Microdosimetric data are usually represented in terms of the measured spectra of the lineal energy, y , i.e., the energy, imparted by single events to a volume divided by its mean chord length. Ideally, the simulated volume is a sphere of 1 μm of diameter of ICRU muscle tissue equivalent [ICRU 1986].

The two concepts, LET and lineal energy (y), differ to the extent that LET represents a *non-stochastic* quantity related to the energy *transferred* by the ionizing radiation. The lineal energy, y , is a stochastic quantity related to the energy *absorbed* in the volume of interest.

5.2 Relative Biological Effectiveness, RBE

5.2.1 Definition of RBE

The RBE is used when two (or more) radiation qualities have to be compared. One of them has to be selected as the reference radiation quality, the other(s) are the test radiation(s) under study. The concept of RBE has been introduced jointly by the ICRP and the ICRU [ICRP 1963] and defined again by the ICRU [ICRU 1979].

The RBE of a test radiation quality compared to the reference radiation quality is the ratio of the absorbed doses delivered with the reference radiation and the test radiation, respectively, that are necessary to produce a given biological effect on a given system (endpoint), all other conditions being the same:

$$\text{RBE}_{\text{test/ref}} = D_{\text{ref}}/D_{\text{test}}$$

A reported RBE value is meaningful only to the extent that the reference radiation quality, the biological system and effect (endpoint), the absorbed dose level and the irradiation conditions are specified. Thus, the validity of a given RBE value is limited to the conditions under which it has been determined. For example, a reported RBE = 3 for ^{12}C relative to ^{60}Co needs the specification of the conditions under which this value has been obtained.

Identical conditions between the compared radiations are practically only achievable in very controlled conditions almost impossible to meet in real clinical situations since the equal effect to obtain would need to produce a set of clinical results with under and over dosage to determine the same endpoint. Therefore, the strict application of the RBE definition is difficult in clinical practice especially in high LET radiotherapy as detailed below. Nevertheless RBE studies, made in laboratory conditions, are necessary and fundamental to apply new types of radiation in clinical practice.

Noteworthy, RBE, as needing equal conditions in both compared irradiation modalities, is fundamentally different of the equieffective concept.

5.2.2 Reference radiation quality

An RBE value can be determined for any couple of two radiation qualities, one of them being selected as the reference. For example the RBE of carbon ions at the middle of SOBP can be given relative to photons but also relative to protons or carbon ions in the initial plateau. However in order to facilitate exchange of information and reduce the risk of confusion, selection of a (general) reference radiation quality would provide obvious advantages.

Initially, 180-220 kV X-rays were selected as the reference radiation quality to define the RBE(s), because of their wide availability [ICRP 1963]. Later on higher photon energies (^{60}Co , photons of ~2-35 MV produced by linacs) progressively became the reference [ICRU 1993]. No significant RBE variation could be detected in this high-energy photon range; it was not the case initially with the 200 kV X-rays [ICRU 1984].

5.3 Practical issues raised by the RBE in clinical practice

Optimal geometrical and technical conditions to make homogeneous irradiation for determining RBE values can be achieved in radiobiological experiments.

Typical examples are mammalian cells in culture irradiated e.g., with 200 kV X-ray beams, ^{60}Co or fast neutrons. RBE-dose relations have been established systematically and published for different cell lines and different endpoints. This set of information is essential as the base for selecting equieffective treatment when starting a new clinical application of a new beam quality radiation.

RBE values can also be derived from animal experiences and clinical observations but in geometrical conditions that are in general not optimal. The absorbed doses are never totally homogeneous and the RBE (dose ratios) can be determined accurately only at reference points and/or in defined volumes. In these last conditions, mean RBE values and/or RBE histograms can be computed and applied.

Besides the difficulties related to geometrical and technical conditions, time-dose patterns raise additional and important issues. Patients are currently treated in well-established time-dose patterns, using many fractions, over long overall times (see the isoeffective dose concept, Chapter 1). However, fractionations similar to that currently applied to patients are difficult or impossible to use in experimental conditions making laboratory experiment difficult to extrapolate to human use. In a way there is no ideal situation.

Therefore these aspects should mainly be studied in realistic clinical situation. It is thus strongly needed to analyze as thoroughly as possible the cumulative human experience obtained in this domain, providing that the physical absorbed dose together with the clinical outcome (TCP and NTCP (early and late complications)) are jointly reported to make possible to determine equieffective treatments.

5.4 Specific RBE issues in carbon-ion therapy

The section above (see 5.3) identifies some of the difficulties encountered in general when determining RBE values and selection of the RBE for clinical applications. Additional difficulties are encountered with carbon-ions [Wambersie 2004a].

5.4.1 Carbon-ion beams have different LET spectra and RBE as function of depth

In carbon-ion, beams, a (quasi) homogeneous irradiation can be obtained in defined volumes (e.g., PTVs, OARs) in terms of (physical) absorbed dose or (biologically transformed) equieffective dose. However in these volumes the distribution of LET is never homogeneous and depends on the

method of beam production, depth, beam combination, etc. Today modern computer technology allows one to obtain LET spectra at selected points and volumes.

The lack of homogeneity of LET introduces an additional factor of inhomogeneity of the RBE, which still depends on dose level, fractionation and biological endpoint at each point of the irradiated volume. RBE values at each point of the volume thus have to be derived specifically for given selected endpoints. This represents a huge amount of computing only possible by the application of appropriate biological hypotheses and bio-mathematical models. An agreement on these biological hypotheses and models is thus essential when comparing data from different centres.

A large number of experimental RBE data has been published for carbon ions from Berkeley, mainly from NIRS in Chiba and from Darmstadt-Heidelberg and associated laboratories. In addition the large amount of systematic data obtained with fast-neutrons (high-LET radiation) can be carefully extrapolated to the carbon-ion situation for different endpoints.

5.4.2 Secondary particles contribution to the energy deposition

The fragmentation of the carbon ions is a major phenomenon that contributes to the energy deposition and introduces heterogeneity in the particle beam that should be taken into account in the model of the LET spectra. This needs to introduce a model of nuclear fragmentation to accurately compute the contribution of secondary particles.

5.4.3 The low number of fractions and short overall times in carbon-ion therapy makes time parameters crucial

The constant discrepancy of the equieffective dose per fraction between the reference treatment (often 2 Gy) and carbon-ion therapy (often much higher than 2 Gy) introduces a hypofractionation and an acceleration of the treatment that are very important for a true comparison. This makes the prescription of an equieffective treatment almost impossible to calculate today due to the lack of global models. Clinical results are thus absolutely necessary since they are per nature integrating all the parameters of the transforming function.

5.4.4 The multiplicity of the models

Presently there is no agreement on the biological and bio-physical hypotheses sustaining the different models, making difficult the detailed comparison of the data from different centres. We are still in a period of development and search of new models since the historical models, although practically efficient, are scientifically unsatisfactory and deserve improvement. Consequently, beside the continuation of investigations and development in this field, it is presently necessary to propose guidelines to register and collect a minimal set of data of each treatment to be able recalculate the equieffective treatment with any type of the present and future models.

Actually a unifying effort to generalize a unique consensual model is presently useless if either possible. It is better to leave open the possibility to pursue innovative developments for dose calculation, treatment planning and treatment protocols to produce large body of clinical data which could thereafter be challenged in meta-analysis comparisons.

5.5 Approaches to available the RBE and equieffective treatment for carbon-ion applications

High-LET particles have different biological effectiveness compared to photons: reduction of the OER, reduction of the radiosensitivity related to the cell cycle, less repair, etc. This is the main rationale for using carbon ions in radiation therapy. Several approaches have been used for including radiobiological effects into treatment planning for ion-beam therapy [Wambersie 2004b].

To now, three procedures or models have been or are actually applied to incorporate RBE into TPS for carbon-ion therapy [Gueulette 2007]:

- 1- the initial NIRS procedure, which consists in a parametric description of human salivary gland response to carbon beam and in a rescaling of physical dose, tumour shape and type dependence, to benefit from neutrontherapy experience;
- 2- the GSI (Gesellschaft für Schwerionenforschung) approach, which is based on the Local Effect Model (LEM), for which the original version among four is applied to therapy;
- 3- a modified version of the Microdosimetry Kinetics Model (MKM), which is replacing in Japan the initial empirical procedure.

Conceptually, although these three approaches are strongly different, they all need biological data measured for high-LET beams not only to evaluate their predictions but also as necessary input.

Beside these models, other existing models could also be applied to ion-beam therapy. Alternative models are under development, as for instance in Oxford or Lyon, or in the context of active research in the domain of nanodosimetry and microdosimetry. Trying to get too soon a consensus would lead to a non-scientific choice and a non-achieved solution. Instead it would be urgent to convince companies developing TPS to modify their software, on one hand to store and let access to sufficient information on the treatment plan for rigorous research program, on the other hand to plug any relevant biophysics models.

5.5.1 The classic NIRS approach

Passive scattering with fixed beams is used. The selection of the transformation function (currently called "clinical RBE" in the Chiba reports) is based on the past neutron experience. A value of 3 was the "clinical RBE" applied for neutrons in Chiba, i.e., an average value for effectiveness on tumours and normal tissue tolerance (except CNS). This value was considered to be satisfactory for general clinical applications. The mean LET for fast neutrons is about 80 keV/μm, Fig. 5.1. A similar LET value was measured in the carbon-ion beams at the point located at 2/3 of depth in the SOBP. Therefore the "clinical RBE" value of 3 was assumed at that point. The variation of the clinical RBE within the SOBP is based on several sets of experiments performed at the Chiba facility and the flattening of the clinical biological dose of the SOBP is obtained by the use of a reference human cell line of salivary gland which need the introduction of a supplementary correction factor, named scaling factor, between the RBE obtain in-vitro for HSG and the "clinical RBE". For the Fig. 5.2, the scaling factor is close to 1.5 [$2.7 / 1.84 = 1.47$] and is applied to the whole SOBP [Wambersie 2010].

5.5.2 The GSI approach

In Darmstadt-Heidelberg a different approach was developed in the context of the carbon-ion pilot project at GSI, which introduced the first completely active scanning system for radiotherapy [Kraft 2007]. The isoeffective dose is computed point by point ("voxel") in the PTV taking into account different factors: local LET, absorbed dose level, dose per fraction, selected biological system and effect ("endpoint"), etc. These factors are not independent from each other.

The PTV voxels are sequentially irradiated with the scanning native pencil beam that delivers planned amounts of energy over a given time. These energy deposits are related to a coordinate system bound to the beam/room. Conformal dose distribution is achieved by optimizing the number and the incidence of the beams

Thus a major goal was to enable the calculation of the "RBE-weighted" (local terminology) dose distribution and all related quantities on the 3D voxel grid given by the planning CT.

At the very core is the Local Effect Model (LEM I [Scholz 1997] and LEM IV [Elsaesser 2010]), which provides biological base data sets of single-particle α_z , β_z values for each tissue type and biological endpoint.

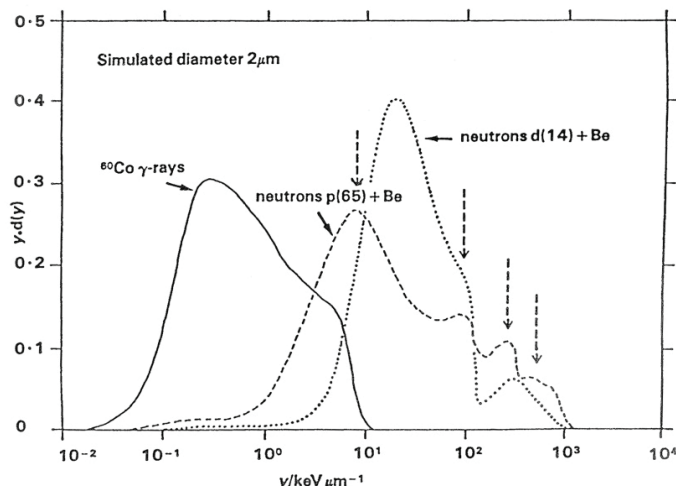


Figure 5.1: Comparison of the microdosimetric spectra $y.d(y)$ vs. y obtained for ^{60}Co γ -rays, $d(14)+\text{Be}$ neutrons and $p(65)+\text{Be}$ neutrons, i.e., the lowest and highest neutron energies applied for therapy, respectively. y is the lineal energy and $d(y)$ is the probability density of absorbed dose in y . For ^{60}Co γ rays, the maximum $y.d(y)$ value occurs at about $0.3 \text{ keV } \mu\text{m}^{-1}$ and for $d(14)+\text{Be}$ neutrons it occurs at about $20 \text{ keV } \mu\text{m}^{-1}$. Four peaks are observed in the $p(65)+\text{Be}$ neutron spectrum (vertical arrows): at about $8 \text{ keV } \mu\text{m}^{-1}$, $100 \text{ keV } \mu\text{m}^{-1}$, $300 \text{ keV } \mu\text{m}^{-1}$ and $700 \text{ keV } \mu\text{m}^{-1}$, corresponding to high-energy protons, low-energy protons, 4He particles and heavy recoil nuclei, respectively [Gueulette 1998].

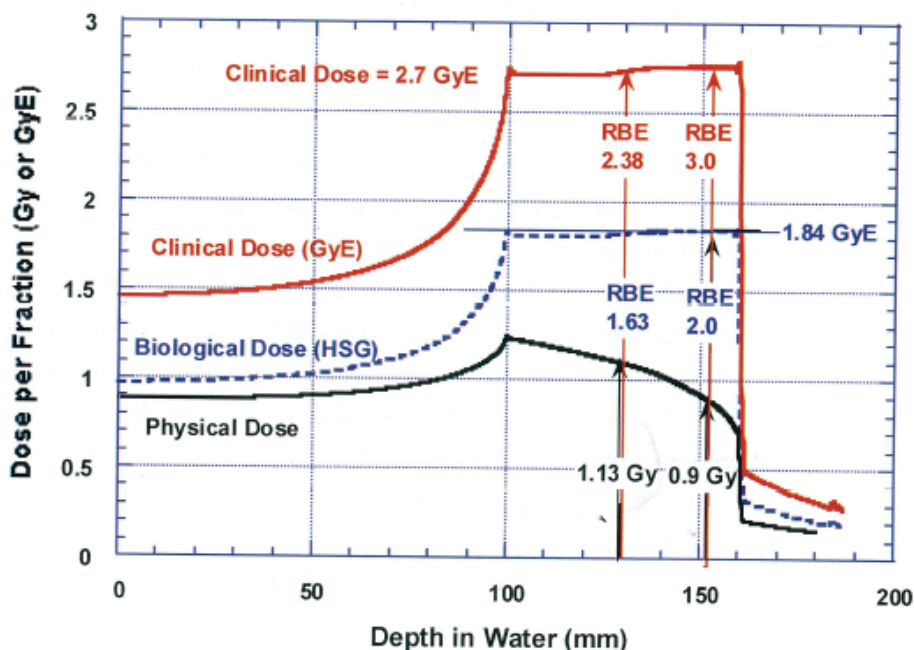


Figure 5.2: Depth-dose curves in the 290 MeV/u carbon-ion beam with a 6 cm SOPB at NIRS Chiba-Japan. The doses per fraction are compared. In black: the physical absorbed dose. In blue: the "radiobiological" (dose derived from cellular radiobiological experiments). In red: the "clinical" dose (derived from historical clinical neutron experience having a LET of $80 \text{ keV}/\mu\text{m}$, see text) (modified from T. Kanai, et al., [Kanai 2006]).

LEM relies on semi-empirical dose-effect curves for photon radiation, usually described by α_x , β_x and a transition dose D_t above which the dose-effect curve becomes linear. Further parameters are the size of the cell nucleus and the microscopic radial dose distribution $D(r)$ around a single ion's path.

With this approach relatively easy accessible physical data ($D(r)$, nucleus size) are separated from biological data which so far can only be determined empirically (photon dose-effect curve). This way even "exotic" endpoints can be handled, provided a photon dose-effect curve exists.

For a treatment plan, the biological single-particle base data sets are combined with physical base data (such as LET tables) and with the parameters of the actual radiation field, i.e. particle numbers in each beam spot and the energy distributions of primary and secondary particles in each voxel [Kraemer 2010, Kraemer 2006].

The primary quantities obtained this way are 3D distributions of biological effect and survival, from which the RBE-weighted and equieffective doses and can be deduced.

This approach is very flexible since it separates the invariant quantities (biological and physical base data) from patient specific ones (particle fluence maps) and thus allows for sophisticated dose optimization algorithms.

Dose reporting would comprise several quantities. Besides the traditional absorbed dose per fraction, taken for example at the isocenter, the calculated RBE and equieffective dose (and associated quantities such as survival per fraction) can be provided. For some configurations, such as two opposing fields RBE varies only slowly over the PTV. It is, however, still model dependent.

The most basic way of dose reporting for a scanning system would be to provide the particle fluence maps used for the actual irradiation, together with the planning CT and auxiliary information about the beam path, such as ripple filters and boli. These maps are usually kept and archived for exactly this purpose, but would require a fully-fledged TPS to recalculate dose distributions.

The GSI approach was used clinically in the pilot project and subsequently has found its way into commercial treatment planning systems such as the Siemens SynGo/PT, which is currently used at HIT ((Heidelberg Ion-Beam Therapy Center) and Marburg (both Germany) as well as in CNAO (Italy) and Shanghai (China). The company RaySearch (of Sweden) has agreed to integrate it into their TPS, which is earmarked for use at MedAustron. Meanwhile, the original GSI TPS, TRiP98, is continuously being further developed as a research prototype.

5.5.3 A new NIRS approach

The classical NIRS approach works well for passive systems and treatment configurations close to the one for which empirical data are available. It is not usable for active scanning systems with their need to optimize 3D dose distributions.

For the sake of completeness it should be mentioned that an alternative way to handle biological effects was developed at NIRS [Inaniwa 2010]. It is meant for use with their new scanning system and is based on the Microdosimetric Kinetic Model (MKM) [Kase 2006].

MKM relies on microdosimetric spectra and several empirical parameters to calculate cell survival, from which other quantities (like RBE, equieffective, etc) can be deduced. It provides similar predictions as LEM; it is not used clinically in the European context.

5.6 Radiation quality measurements of ion-beam therapy facilities

The idea of using radiation quality measurements in connection with ion-beam therapy has been considered in different facilities. Main goal is the decreasing of the uncertainty of the physical

parameters of the radiation that are linked to the biological effectiveness making two- and three-dimensional mapping of these parameters with a resolution of the order of the millimeter.

It is reported here a non-exhaustive overview of several devices and methodologies studied at different ion-beam therapy facilities. Some of these methods have been implemented already, some others are still in progress [Magrin 2014].

The measurements of the radiation quality could be associated to three different areas related to the radiation therapy:

- Beam characterization and dosimetry. In this framework radiation quality measurements can be performed during commissioning of the facility and/or periodically during operation as a process of quality assurance.
- Benchmarking Monte Carlo codes and verification of biological models. In this framework the measurement of the radiation quality and, possibly, the consequent biological effectiveness, are compared with the forecast of simulation and treatment planning.
- Measurements during the patient treatment. This includes the measurements of the radiation quality in the target volume, in the region surrounding it or in significant locations of the full body of the treated patient. The scope is to collect information on physical parameters which can be later correlated to the biological effectiveness in the tumour, in the healthy tissue surrounding it, or in vital organs at risk.

GSI, HIMAC (Heavy Ion Medical Accelerator in Chiba), HIT, and WPE (Westdeutsches Protonentherapiezentrum Essen) studied the ion beams at different energies using commercial tissue equivalent proportional counters. The studies evaluated microdosimetric spectra of carbon ions for a range of beam energies and at different distance from the beam axis. At this stage these procedures are not implemented as routine measurements and are not performed regularly at the centres. They were carried out to test the capability of collecting measurements of the radiation quality in the radiation fields that are typical of ion-beam therapy. A crucial point is that commercial microdosimeters have been developed to be used for radiation protection purposes. These radiation fields are quite different from those used in ion-beams therapy. In particular the dose rates of therapeutic beams are thousands of times higher than the typical fields measured in radiation protection.

At the proton therapy centre of Nice, a series of microdosimetric measurements were taken at different location of a spread out Bragg peak [De Nardo 2004]. These spectra were used not only to specify the changes of the radiation qualities at different residual ranges of the protons but also to estimate indirectly the variation of the biological effectiveness at the specified point using the weighting function suggested by Loncol [Loncol 1994]. The detector used for that purpose was a miniature TEPC, result of the joint effort of Columbia University and INFN Laboratories in Legnaro. That prototype and the later versions are the most appropriate tools for the characterization of therapeutical ion beams at least in the cases of beam fluxes below 100000 particles per square millimeter per second.

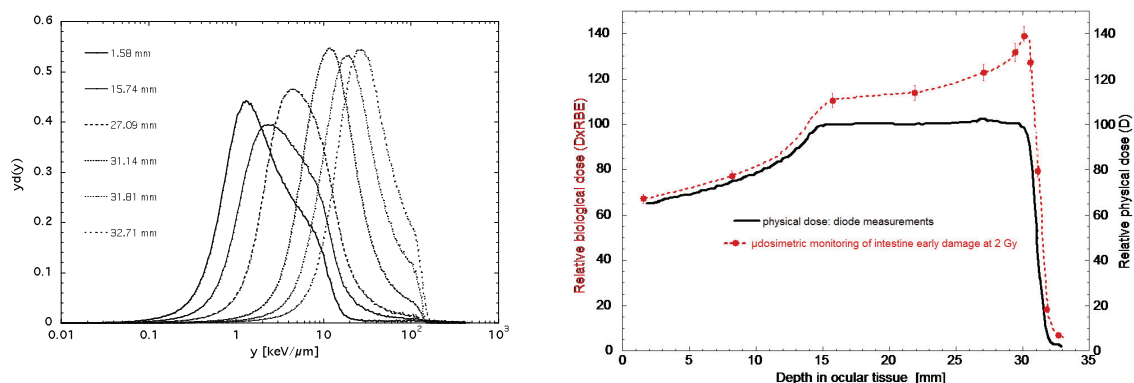


Figure 5.3 (a) Microdosimetric spectra collected in the Nice proton therapeutic beam at different SOBP depth. (b) Biological dose (dashed line), calculated by using microdosimetric spectra in (a) and the weighting function from Loncol [Loncol 1994] for in-vivo murine intestine early damage at 2Gy. Extracted from [De Nardo 2004]

HIMAC is using radiation quality measurements based on microdosimetry to estimate the clinical dose. As described in the present document in subsection 5.5.3, the new model used at HIMAC to specify RBE (the MKM) uses microdosimetric quantities. Therefore microdosimetric parameters can be used to estimate the clinical RBE. At the same time the integral of the microdosimetric spectrum corresponds to the dose imparted. A single microdosimeter provides therefore the two independent values of RBE and dose, which, multiplied, give the biological weighted dose, named at HIMAC $D_{RBE,NIRS}$ [Tsuji 2014] to avoid confusions with other RBE-weighted doses (see note on section 2.1). These “measurements” are used to cross check the MKM-based treatment planning.

Loma Linda University Medical Center, LLUMC, is studying and developing a detector that operates at nanometric scale. The operative concept of this device is different from that of proportional counters and it is based on the detection of positive ions a low intensity electric field instead of the electron avalanche as in the case of TEPCs. The resolution of the order of 2 nanometers allows a characterization of the ionization in the two distinct ionization components, one due to the primary particles and the other produced by the secondary electrons. Because of the decrease of the simulated sized to the nanometric region, these kind of detectors are generally named nanodosimeters. One goal of LLUMC is to use them to validate simulation codes for energies of the secondary electron typical of ion beam therapy that have otherwise very limited experimental data.

WPE introduced measurements of radiation quality during the treatment of the patients with proton beams. Using the different response of three thermoluminescent materials to radiation quality, WPE estimated the dose of neutron and gamma radiation which is due to the interaction of the primary protons with the atoms of patient’s body or of the external environment. This dose is delivered to all organs of the patient’s body also if they are distant from the location of the tumour. It increases the risk of secondary cancer and can have a negative impact to quality of life of the patients. In particular for paediatric treatments, these are important parameters to consider.

The possibility of using active detectors during the ion-beam treatment is under study. Since the goal is to measure the radiation quality in the proximity of the irradiated volume (PTV), the devices must be compatible with *in situ* measurements possibly with a miniaturization down to overall volumes of less than 1 cubic millimeter. MedAustron is looking at active solid-state detectors and promising devices as those based on silicon diodes developed by Wollongong University [Rosenfeld 2000] and Politecnico di Milano [Agosteo 2010]. A series of prototypes based on Chemical Vapour Deposition diamond were also developed [Rollet 2012] in a collaboration with

Austrian Institute of Technology (Vienna), ENEA (Rome), Torvergata University (Rome), and MedAustron and studies for the implementation in the therapeutical procedures are under way.

6 Research and development in particle-beam therapy

6.1 In the field of oncology - Uncertainties on the CTV and PTV

In order to exploit the high degree of physical selectivity of the carbon-ion beams, it is essential to delineate the PTV with the highest accuracy.

This would include modern imaging, histo-pathological techniques, prognostic factors, statistical/epidemiological information, etc.

6.2 In the field of engineering, physics, dosimetry

Improving the beam quality, relevant parameters and accurate dosimetric methods. Comparison of routine dosimetric methods for dose distribution evaluation.

Better information on radiation quality and comparison with current microdosimetric techniques. Evaluation of relative merits and expected benefits of nanodosimetric approaches.

A tentative list of such initial **data collection** could be:

- Type of particles
- Kinetic energy, direction, time and coordinate at the entrance point in the body for each particle of the treatment
- Presence of accessory able to produce secondary particles (neutrons)
- Anatomic data given by the image file of the DICOM RT standard
- Co-registered multimodality imaging (MRI)
- Biological data related to the tumour as imaging files (radiosensitivity, hypoxia, molecular imaging files...)
- Data related to the patient:
 - o radiosensitivity profile,
 - o associated treatments (modifying drugs, antineoplastic treatments)
 - o comorbidity (radiosensitizing conditions, dys-immune conditions, etc.)

6.3 In the field of radiobiology

Improving the relation on the beam parameters (e.g., LET) and the dose effects relations for the relevant endpoints. According to the numerous number of parameters, this could only be approached by elaborated models. However, no model presently exists to calculate an Equi/Isoeffective treatment. Numerous models are existing for RBE calculation, but no one is currently considered as definitely satisfying for universal use leaving the place to different calculation protocols in the different carbon-ion facilities.

6.4 Treatment planning in particle beam therapy and related uncertainties

The characteristics of each beam to treat a PTV should be adapted, including dimensions and angle of incidence under which the PTV is reached but also the nature (density and atomic composition) and movement of tissues which are along the beam path.

These factors combine their own uncertainties which have to be taken into account when defining each delivered beam. For example the uncertainty in the density of the tissues between the treatment head and the PTV impose an appropriate choice of the particle energy, and will therefore influence the (surrounding) irradiated normal OAR quite specifically depending the type of beam. This alteration (that is mild for photons) is significant for charged particles.

As a consequence of the variety and the fast improvement in particle therapy techniques (passive diffusion, active or semi active control, available incidences, etc.) it is necessary to identify all factors which influence in the definition of the safety margin when going from CTV to PTV. Some

of these factors are related to the movements of the patient organs (PTV(s) and OAR(s)) which should be controlled and kept as limited as (physiologically) possible. Other factors depend on the constraints imposed by the treatment technologies.

In the present state of knowledge and techniques, established concepts are well suited to treat immobile tumours in a stationary environment. Moreover, the tumours of which we can master the movement, either by efficiently preventing it during the beam shot, or by modelling it adequately, can truly be treated by techniques which only the margins and distance are influenced by the uncertainties of position, but not the internal homogeneity of dose deposition. This is true of all types of beams that have a physical continuity and homogeneity of the irradiated volume at any time. This is the case for photon beams, electron beams and passively scattered charged particles.

It is different for the beams that are inherently heterogeneous in time and space as those produced by active control techniques (beam scanning, raster scanning, spot scanning). Whatever the residual movements, able to be modeled or not, the currently available means of quality control of the dose distribution do not guarantee an absence of overdosing and even more underdosing in the PTV. So whatever the techniques used, this remains in the domain of research and development

Two issues are thus crucial in this area:

- first, the techniques of motion compensation (repainting, tracking, etc.), which are very sophisticated but with promising results;
- second, the techniques of quality control which are neither available yet nor having an expected level of precision able to ensure, a real-time or deferred time, quality of dose deposition in tissues (and not only the quality of the particle distribution in space). Indeed a dose heterogeneity of a millimeter scale and several % is not yet measurable, by far. This aspect is certainly the most limiting one for the implementation of active beam techniques for treating mobile tumours.

This underscores the relevance of particle beam therapy techniques that would be less sensitive to the movements of the target to enlarge the scope of therapeutic indications.

Finally, the most universal approach for mastering the uncertainty of position of CTV remains for now an adaptation of the safety margins around the CTV to define the PTV. In this area the concept of weighted margins according to the probability of presence of the target is a major step for the protection of organs at risk. Works and future studies should concentrate on defining for particle therapy the different modalities of this weighting with ballistic and biological dimensions and to define probability thresholds to associate with the dose prescription.

7 Conclusions and recommendations in ion-beam therapy

7.1 Treatment conditions

In order to be able to understand and interpret the dose prescription and delivery, a complete description of the irradiation technique, dosimetric technique, time-dose pattern and other treatment conditions should be provided. A complete description of the protocol should always be available. In particular the PTV should be reported in a way one could reproduce exactly the treatment, including volume (dimensions and extents) and dose distribution. These data are provided in the DICOM-RT format.

7.2 Summary of the medical history

A brief medical history should be presented including staging, time when it has been performed and the used techniques.

The effectiveness of the treatment should be evaluated (e.g., GTV regression) and the side effects reported (organs damaged, and severity of the lesions). An anatomical description may be needed.

Most recent international references should be used for:

- staging with the reference year of the classification in order to avoid bias in recruitment [UICC 2009]
- evaluation of efficiency/side effects to avoid bias when the effects of treatments are compared [WHO 2000].

7.2.1 Clinical data collection and patient follow-up

A very critical point is to register, along the follow-up of the patient, a minimal set of clinical data to make possible the correlation between delivered dose and equieffective dose or isoeffective dose. These data should describe the tumour control and the side effects. Universal form and schedule for this collection should be proposed on a prospective way. According to the rather small number of carbon-ion therapy patients this survey should be proposed to all patients and could feed a centralized data base. Patients will be generally treated in centres far away from their home and will not be routinely followed in the particle therapy centre. This is a serious difficulty, including for prospective trials. Facilitation of such a survey could rely on a pre-scheduled and prepaid set of consultations in the treating centre, for instance at 1 year and 5 years.

7.3 Quantities and units for prescribing and reporting

In carbon-ion therapy, the doses should be prescribed and reported in terms of equieffective D_{EquiE} or isoeffective D_{IsoE} dose quantity, i.e., two "biologically transformed" quantities. However, in addition, in carbon-ion therapy as in any radiation therapy technique, the (physical) absorbed doses should also be prescribed and reported at the points and/or volumes of interest. From these two sets of dose quantities (D_{EquiE} or D_{IsoE} and absorbed dose) the value of the transformation function can be derived. Alternatively when one set of dose quantity and the value of the transformation function are given, the other set of dose quantity can be derived.

When D_{EquiE} or D_{IsoE} are reported, all factors that are involved have to be specified such as the reference treatment technique, the biological system and effect (endpoint), the models and numerical values of the parameters used when applying the models, the irradiation conditions.

If the approach and methods used to perform the dose transformation(s) and to evaluate D_{EquiE} or D_{IsoE} are fully specified, it becomes possible to repeat/compute the evaluation of D_{EquiE} or D_{IsoE}

using different hypotheses or models. Harmonisation (and agreement at the international level) on these approach and methods is one of the goals of the ICRU efforts.

7.4 Treatment prescription and reporting

In carbon-ion therapy, the treatments are currently prescribed and reported using biologically transformed (some time named “weighted”) dose quantities i.e., equieffective and/or isoeffective dose. Actually in the ion-beam therapy centres, one attempts to prescribe/report the treatment in terms of isoeffective dose quantity because it relates to the large patient series treated (today and in the past) using photons, with 2 Gy per fraction and 5 fractions per week. The radiation oncologists are thus familiar with the numerical values of the isoeffective doses D_{IsoE} which can avoid important errors in the prescriptions.

When dose and dose distribution is prescribed in terms of D_{EquiE} the reference treatment technique has to be specified which includes mainly time-dose pattern and biological endpoint. Prescription is the responsibility of the radiation oncologist (team) in charge of the patient. It is based on personal and local experience and tradition along with published/historical clinical data.

The radiation oncologist is willing to obtain a certain clinical effect and therefore is thinking in terms of equieffective or isoeffective dose. From the complete description of the equieffective and/or isoeffective doses (time, dose, fractionation, ...), the corresponding (physical) absorbed doses that has to be delivered can be derived using the transformation function which includes the effects of the RBE, fractionation, overall time and the selected biological endpoint. These factors are not independent from each other. The biological models and hypotheses, and the numerical values of the parameters should be specified and reported. The (physical) absorbed dose(s) and dose distribution(s) to the PTV(s) and OAR's constitute the prescription that the radiation oncologist is forwarding to the physics team.

It is obvious that for collaborative/randomized trials (or scientific/clinical retrospective studies) the same biological models and hypotheses, and the same numerical values of the parameters need to be applied. If this is not the case, for the same specified equi/isoeffective doses, different (physical) doses will be derived i.e., prescribed and delivered to the patient.

When comparing the treatments delivered in different centres, if the doses are reported only in terms of isoeffective doses, and if different transformation functions are used, this means that, for the same stated isoeffective dose the patients are receiving different absorbed doses. Then to avoid confusion, the prescription and reporting of the treatment should include two series of dose values: (1) equi(or iso)effective doses and (2) (physical) absorbed doses. These quantities need to be related to biological hypotheses, models and numerical values of the involved parameters.

As indicated, reporting the treatment should describe in detail the (physical) absorbed doses, which has usually a heterogeneous distribution. Reporting (physical) absorbed dose has the advantage of being independent from any biological hypothesis. Consequently, from the description of the absorbed doses, different sets of equieffective doses and/or isoeffective doses could be derived depending on different biological hypotheses included in the transformation function. The interest of the equieffective (isoeffective) doses is to facilitate a closer relation with the expected clinical effects and a closer comparison with published/historical clinical data. Remarkably, the equi-/isoeffective is usually made homogeneous throughout the PTV and is therefore easier to be reported.

7.5 Reporting DVH(s) versus doses at reference point(s)

Today due to the dramatic technological development, reporting the dose volume histogrammes DVH can be performed routinely and can thus be recommended as a current practice in ion-beam therapy. The DVH should be expressed using both quantities i.e., absorbed dose and equieffective

dose (or isoeffective dose). It should be reported for all the volumes considered relevant for the study i.e., related to the tumour GTV, CTV, PTV and selected OARs).

As stressed before, when a DVH is expressed in terms of D_{EquiE} (or D_{IsoE}), the involved biological systems and endpoints, models and hypotheses (including the selected numerical values), the irradiation conditions and reference treatment technique have to be specified.

On the DVH related to the tumour (i.e., PTV), any dose level can be reported if useful. However, in order to facilitate exchange of information between centres, reporting D50%, D98% and D02% values are recommended. The modal dose, D50%, provides a relevant representation of the dose distribution in the volume of interest and is therefore particularly recommended.

When different techniques are combined in a global treatment strategy (e.g., IMRT and ion beams as in Heidelberg for salivary glands), different PTVs may be defined. Adding the corresponding DVH doses may be difficult and the selection of traditional ICRU reference points related to well defined anatomical references have obvious advantages.

When passive scattering and few ion beams are used, it is straightforward to specify the absorbed dose and equieffective (isoeffective) dose delivered to the PTV at a point on the beam axes at the centre of the SOBP (selected as the ICRU Reference Point). Computing and displaying the dose distributions in the appropriate planes allows one to select the most relevant reference points for reporting doses and outcomes, avoiding some pitfalls related to dose inhomogeneities. Reporting only the DVHs is missing an anatomical reference, which is important when different treatment techniques are combined or compared. The (physical) absorbed doses and equieffective doses have to be reported at the selected reference point(s).

The two methods for reporting dose i.e., at reference point(s) and on DVH should be applied together, when possible, because they may better fit to one of the two methods of beam delivery of ion-beam therapy (i.e., passive beam scattering with reference point and scanning beams with DVH) which are used today and form the basis of our clinical experience.

7.6 The reported volumes in ion-beam therapy

Like for the other radiation-therapy techniques, all clinically relevant volumes should be reported (such as PTV, CTV, GTV and OAR(s)). When reporting doses to volumes treated by ion-beam therapy, it is essential to indicate where (and how) the doses are specified. In case ion beam is part of a combined cancer-therapy strategy (e.g., as a boost), the time when ion-beam therapy is started (or after which dose) should be indicated (this is part of the 4D specification).

Doses delivered to a given volume/point with different techniques and/or radiation qualities cannot simply be compared/combined/added. First they need to be related to common anatomical reference points or coordinate systems. In addition they have to be expressed in terms of equieffective dose, evaluated relatively to the same reference technique and using the same methodology and radiobiological concepts and hypotheses. Only if these criteria are satisfied, the equieffective doses can be added.

Reporting the GTV

For reporting the GTV, the following parameters should be indicated:

- anatomical location, extent, volume and dimensions (three orthogonal dimensions).
- technique(s) used for evaluation.
- time when evaluation was made (in relation to the start of the treatment or absorbed dose delivered).
- information about functional subvolumes (if relevant).

Because delineation of a GTV may vary according to the diagnostic modality and as a result of the treatment, a clear notation is required.

Reporting the CTV

Following parameters should be reported:

- The anatomical location, extent, volume and dimensions (three orthogonal dimensions).
- Specification of the corresponding GTV (if applicable)
- Identification of high and low risk CTV(s) (if relevant)
- The time when evaluation was made (in relation to the start of the treatment or absorbed dose delivered).

When several CTVs are used, it is recommended that an unambiguous terminology corresponding to the GTV denomination be used. This is especially true for ion-beam therapy when ion beams are used as a boost after a larger PTV treated with photons.

Reporting the PTV(s)

A single or several PTVs may be prescribed and treated. When more than one PTV is prescribed, they can be irradiated successively or simultaneously. They should be prescribed and reported in such a way that the full treatment could be reproduced exactly. The time pattern of the PTVs irradiation in the general time frame of the whole treatment strategy should be clearly indicated.

For the different PTVs reporting should include the specification of the corresponding CTV(s) and GTV if relevant.

For each PTV, the following parameters should be indicated:

- anatomical location, extent, volume and dimensions (three orthogonal dimensions).
- technique and dosimetry planned for the treatment.
- time of the PTV irradiation in the general frame of the whole treatment strategy and in particular other irradiation components.
- information about functional subvolumes (if relevant).

REFERENCES

- [Agosteo 2010] S. Agosteo, A. Pola, Silicon Microdosimetry. *Radiat Prot Dosimetry* 2010; 143: 409–415.
- [AJCC 2010] S.B. Edge, D.R. Byrd, C.C. Compton, A.G. Fritz, F.L. Greene, and A. Trotti, editors. *Cancer Staging Manual (AJCC American Joint Committee on Cancer)*, Springer, 7th edition, 2010.
- [Banse] Banse X et al., Surgical accuracy and risk of intralesional resection, UCL, Belgium, in preparation.
- [Bentzen 2012] S.M. Bentzen, W. Dörr, R. Gahbauer, R. W. Howell, M.C. Joiner, B. Jones, D. T.L. Jones, A. J. van der Kogel, A. Wambersie, G. Whitmore, Bioeffect modeling and equieffective dose concepts in radiation oncology – Terminology, quantities and units, *Radiother Oncol* 2012;105:266–268
- [Bert 2008] C. Bert, S.O. Grözinger, E. Rietzel Quantification of interplay effects of scanned particle beams and moving targets. *Phys Med Biol.* 2008 May 7;53(9):2253-65.
- [BIPM 2006] Bureau International des Poids et Mesures, The International System of Units (SI), 8th Edition, BIPM, 92312 Sèvres Cedex, 2006
- [De Nardo 2004] L. De Nardo, V. Cesari, N. Iborra, et al. Microdosimetric assessment of Nice therapeutic proton beam biological quality. *Physica Medica* 2004; XX: 71.
- [Elsaesser 2010] T. Elsaesser, W. Kraft-Weyrather, T. Friedrich et al. Quantification of the relative biological effectiveness for ion beam radiotherapy: Direct experimental comparison of proton and carbon ion beams and a novel approach for treatment planning, *Int J Radiat Oncol Biol*, 78:1177-83, 2010.
- [Fowler 1989] J.F. Fowler. The linear-quadratic formula and progress in fractionated radiotherapy. *Br J Radiol* 1989;62:679–94
- [GEC-ESTRO 2010] T.P. Hellebust, C. Kirisits, D. Berger, J. Perez-Calatayud, M. De Brabandere, A. De Leeuw, I. Dumas, R. Hudej, G. Lowe, R. Wills, K. Tanderup; Recommendations from Gynaecological (GYN) GEC-ESTRO Working Group: considerations and pitfalls in commissioning and applicator reconstruction, in 3D image-based treatment planning of cervix cancer brachytherapy, *Radiother. Oncol.*, (2010) 96(2):153-60
- [Grégoire 2003] V. Grégoire, P. Scalliet, and K. K. Ang, editors. *Clinical Target Volumes in Conformal and Intensity Modulated Radiation Therapy – A Clinical Guide to Cancer Treatment*. Springer, 1st edition, November 2003.
- [Grégoire 2006] V. Grégoire, A. Eisbruch, M. Hamoir, and L. Peter. Proposal for the delineation of the nodal CTV in the node-positive and the post-operative neck. *Radiother Oncol*, 79(1):15–20, April 2006.
- [Grégoire 2009] V. Grégoire, K. Haustermans, and J. Lee. Molecular image-guided radiotherapy using positron emission tomography. In M. Joiner and A. van der Kogel, editors, *Basic clinical radiobiology*, chapter 20, pages 271–286. Hodder Arnold, London, 2009.
- [Gueulette 2005] J. Gueulette, H. Blattmann, E. Pedroni, A. Coray, B M. De Coster, P Mahy, and G. Goitein, Relative biologic effectiveness determination in mouse intestine for scanning proton beam at Paul Scherrer Institute, Switzerland. Influence of motion. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 62(3):838–845, July 2005.
- [Gueulette, 1998] J. Gueulette, H.G. Menzel, P. Pihet, A. Wambersie, Specification of radiation quality in fast neutron therapy: microdosimetric and radiobiological approach. *Recent Results Cancer Res.* 1998;150:31-53.
- [Gueulette 2007]. J. Gueulette and A. Wambersie, Comparison of the methods of specifying ion dose at NIRS and GSI. *Journal Radiation Research*, Vol 48, Suppl.A97-102, 2007.
- [Haubner 2010] R. Haubner. PET radiopharmaceuticals in radiation treatment planning – Synthesis and biological characteristics. *Radiother Oncol*, 96(3):280–287, September 2010.
- [IAEA 2007] International Atomic Energy Agency and International Commission on Radiation Units and Measurements, Dose reporting in ion-beam therapy, Joint IAEA-ICRU report, IAEA-TECDOC-1560, IAEA, Vienna, Austria, 2007
- [IAEA-ICRU 2008] International Atomic Energy Agency and International Commission on Radiation Units and Measurements, Relative Biological Effectiveness in Ion-Beam Therapy, Joint IAEA-ICRU report, IAEA-Technical Report Series 461, IAEA, Vienna, Austria, 2008.

- [ICRP 1963] International Commission on Radiological Protection, Report of the RBE Subcommittee to the International Commission on Radiological Protection and the International Commission on Radiation Units and Measurements, 1962, Health Physics, 9, 357-386, 1963
- [ICRP 2010] D. Bartlett, H.G. Menzel, P. Beck, P. Goldhagen, B. Lewis, L. Lindborg, K. O'Brien, H. Schraube, F. Wissmann (prepared jointly with ICRP): Reference Data for the Validation of Doses from Cosmic Radiation Exposure of Aircraft Crew, ICRU Report 84
- [ICRU 1979] International Commission on Radiation Units and Measurements, Quantitative Concepts and dosimetry in Radiobiology ICRU Report 30, 1979
- [ICRU 1984] International Commission on Radiation Units and Measurements), Radiation dosimetry: electron beams with energies between 1 and 50 MeV, ICRU report 35, Woodmont Avenue, Bethesda, Maryland, 20814, USA, 1984
- [ICRU 1986] International Commission on Radiation Units and Measurements, The Quality Factor in Radiation Protection, ICRU Report 40: April, 1986
- [ICRU 1993] International Commission on Radiation Units and Measurements, ICRU Report 50, Prescribing, Recording, and Reporting Photon Beam Therapy, Oxford University Press, 1993.
- [ICRU 1998] International Commission on Radiation Units and Measurements, Fundamental quantities and units for ionizing radiation, ICRU Report 60, Woodmont Avenue, Bethesda, Maryland, 20814-3095, USA, 1998
- [ICRU 1999] International Commission on Radiation Units and Measurements, ICRU Report 62, Prescribing, Recording and Reporting Photon Beam Therapy (Supplement to ICRU Report 50), Oxford University Press, 1999.
- [ICRU 2004] International Commission on Radiation Units and Measurements, ICRU Report 71, Prescribing, Recording, and Reporting Electron Beam Therapy, Oxford University Press, Vol 4, Nr. 1, 2004.
- [ICRU 2007] International Commission on Radiation Units and Measurements and International Atomic Energy Agency, ICRU Report 78, Prescribing, Recording, and Reporting Proton-Beam Therapy, Joint ICRU-IAEA Report 78, Journal of the ICRU, Oxford University Press, Vol 7, Nr. 2, 2007.
- [ICRU 2010] International Commission on Radiation Units and Measurements, ICRU Report 83, Prescribing, recording and reporting Photon-Beam Intensity-Modulated Radiation Therapy (IMRT), Oxford University Press, Vol 10, Nr. 1, 2010.
- [ICRU 2011] International Commission on Radiation Units and Measurements, ICRU Report 85: Fundamental Quantities and Units for Ionizing Radiation Oxford University Press, Vol 11, Nr. 1, 2011.
- [ICRU-GEC-ESTRO] International Commission on Radiation Units and Measurements and Groupe Européen de Curiothérapie -ESTRO, Prescribing, recording and reporting brachytherapy for cervix cancer treatment, Joint ICRU-GEC-ESTRO Report, Journal of the ICRU, in preparation
- [Inaniwa 2010] T. Inaniwa, T. Furukawa, Y. Kase, N. Matsufuji, T. Toshito, Y. Matsumoto, Y. Furusawa and K. Noda. Treatment planning for a scanned carbon beam with a modified microdosimetric kinetic model. Phys. Med. Biol., 55:6721-37, 2010.
- [Joiner 2009] M. Joiner and A. van der Kogel (Eds), Basic clinical radiobiology, Hodder Arnold, UK, 2009.
- [Kanai 2006] T. Kanai et al., Proceedings of NIRS-MedAustron Symposium, 2006.
- [Kase 2006] Y. Kase et al. Microdosimetric Measurements and Estimation of Human Cell Survival for Heavy-Ion Beams, Radiat. Res., 166:629-638, 2006.
- [Kesson 2012] E.M. Kesson, G.M. Allardice, W.D. George, H.J.G. Burns, D.S. Morrison. Effects of multidisciplinary team working on breast cancer survival: retrospective, comparative, interventional cohort study of 13 722 women. BMJ 2012;344:e2718 doi: 10.1136/bmj.e2718 (Published 26 April 2012).
- [Kraemer 2006] M. Kraemer, M. Scholz, Rapid calculation of biological effects in ion radiotherapy, Phys. Med. Biol., 51(8):1959-1970, 2006.
- [Kraemer 2010] M. Kraemer and M. Durante, Ion beam transport calculations and treatment plans in particle therapy. Eur Phys J D, 60:195-202, 2010.
- [Kramer 1984] S. Kramer, A.T. Meadows, G. Pastore, P. Jarrett, D. Bruce, Influence of place of treatment on diagnosis, treatment, and survival in three pediatric solid tumors, J. Clin. Oncol 1984, 2 : 917
- [Kraft 2007] G. Kraft, Tumor therapy with heavy ions, Verein zur Förderung des Tumortherapie mit schweren Ionen,

64291 Darmstadt, Germany, 2007

- [Leunens 1993] G. Leunens, J. Menten, C. Weltens, J. Verstraete, E. van der Schueren, Quality assessment of medical decision making in radiation oncology: variability in target volume delineation for brain tumours. *Radiother Oncol* 1993, 29:169-75.
- [Lim 2009] K. Lim, V. Kelly, J. Stewart, J. Xie, Y.B Cho, J. Moseley, K. Brock, A. Fyles, A. Lundin, H. Rehbinder, and M. Milosevic. Pelvic radiotherapy for cancer of the cervix: Is what you plan actually what you deliver? *International Journal of Radiation Oncology*Biography*Physics*, 74(1):304–312, May 2009.
- [Ling 2000] C.C. Ling, J.L. Humm, S. Larson, H. Amols, Z. Fuks, S. Leibel, and J. A Koutcher. Towards multidimensional radiotherapy (MD-CRT): biological imaging and biological conformality. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 47(3):551–560, June 2000.
- [Liu 2007] H.H. Liu, P. Balter, T. Tutt, et al. Assessing respiration-induced tumor motion and internal target volume using four-dimensional computed tomography for radiotherapy of lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007 Jun 1;68(2):531-40.
- [Lomax 2008] A.J. Lomax. Intensity modulated proton therapy and its sensitivity to treatment uncertainties 2: the potential effects of inter-fraction and inter-field motions. *Phys Med Biol*. 2008 Feb 21;53(4):1043-56.
- [Loncol 1994] T. Loncol et al. *Radiat. Prot Dosim.* 52 (1994) 347
- [Magrin 2014] G. Magrin, R. Mayer, L. Grevillot, Radiation quality and ion-beam therapy: Understanding the users need: *Radiat Prot Dosimetry*; in press
- [Nag 2000] S. Nag, W. Bice, K. Dewyngaert, B. Prestidge., R. Stock, and Y. Yu, The American Brachytherapy Society Recommendations for permanent prostate brachytherapy postimplant dosimetric analysis, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol., Phys.*, (2000) 46,221-230
- [O’Sullivan 2003] B. O’Sullivan, J. Wunder, and P.W.T. Pisters. Target description for radiotherapy of soft tissue sarcoma. In V. Grégoire, P. Scalliet, and K. K. Ang, editors, *Clinical Target Volumes in Conformal and Intensity Modulated Radiation Therapy – A Clinical Guide to Cancer Treatment*, chapter 11, pages 205–227. Springer, 1st edition, November 2003.
- [Rollet 2012] S. Rollet, M. Angelone, G. Magrin et al., A Novel microdosimeter based upon artificial single crystal diamond. *Nuclear Science, IEEE Transactions on* 2012; 59: 2409–2415.
- [Rosenfeld 2000] A.B. Rosenfeld, A New Silicon Detector for Microdosimetry Applications in Proton Therapy *IEEE TRANSACTIONS ON NUCLEAR SCIENCE*, VOL. 47, NO. 4, AUGUST 2000
- [Scholz 1997] M. Scholz, A. Kellerer, W. Kraft-Weyrather and G.Kraft, Computation of cell survival in heavy ion beams for therapy - The model and its approximation, *Radiat Environ Biophys*, 36:59-66, 1997.
- [Sobin 2009] L.H. Sobin, M.K. Gospodarowicz, and C. Wittekind, editors. *TNM Classification of Malignant Tumours (UICC International Union Against Cancer)*. Wiley-Blackwell, 7th edition, November 2009.
- [RCR 2008] The Royal College of Radiologists. *The timely delivery of radical radiotherapy: standards and guidelines for the management of unscheduled treatment interruptions*, 3rd edition, The Royal College of Radiologists, London, 2008
- [Tsuji 2014] H. Tsujii, T. Kamada, Carbon-Ion Radiotherapy, in *Ion-Beam Radiotherapy at MedAustron White Book*. R. Mayer, G. Magrin, T. Schreiner (eds.), 2014. ISBN: 978-3-200-03490-7.
- [ULICE 2011] Union of Light-Ion Centres in Europe, Report D.JRA 2.1, Harmonisation of concepts and terms for volume and dose-volume parameters in photon, proton and carbon-ion therapy, Project co-funded by the European Commission within the FP7 (2007 – 2013), Grant agreement no.: 228436 February 2011
- [ULICE 2012] Union of Light-Ion Centres in Europe, Report D.JRA 2.5, Harmonisation and recommendations for prescribing and reporting absorbed doses and dose-volume histogrammes based on 3D and 4D concepts, Project co-funded by the European Commission within the FP7 (2007 – 2013), Grant agreement no.: 228436 August 2012
- [van de Bunt 2006] L. van de Bunt, U.A. van der Heide, M. Ketelaars, G.A.P. de Kort, and I.M. Jürgenliemk-Schulz. Conventional, conformal, and intensity-modulated radiation therapy treatment planning of external beam radiotherapy for cervical cancer: The impact of tumor regression. *International Journal of Radiation Oncology*Biography*Physics*, 64(1):189–196, January 2006.

- [van de Bunt 2008] L. van de Bunt, I.M. Jürgenliemk-Schulz, G.A.P. de Kort, J.M. Roesink, R.J.H.A. Tersteeg, and U.A. van der Heide. Motion and deformation of the target volumes during IMRT for cervical cancer: What margins do we need? *Radiotherapy and Oncology*, 88(2):233–240, August 2008.
- [Wambersie 2009] A.Wambersie, P.Andreo, P.M.DeLuca, R.Gahbauer, J.H.Hendry, D.T.L.Jones, H.G.Menzel, G.Whitmore, Biological weighting of absorbed doses in particle-beam therapy: ICRU-IAEA recommendations on the isoeffect-dose concept, International Conference on Advances in Radiation Oncology, ICARO April 2009, IAEA, Vienna, CN-170, 324-325.
- [Wambersie 2004a] A. Wambersie, P.M. DeLuca, P. Andreo, J.H. Hendry, “Light” or “Heavy” Ions: a debate of terminology?, *Radiotherapy and Oncology* 73(Suppl.2), iii, 2004
- [Wambersie et al. 2004b] A. Wambersie, J. Hendry, J.Gueulette, R.Gahbauer, R.Pötter and V.Grégoire, Radiobiological rationale and patient selection for high-LET radiation in cancer therapy, *Radiotherapy and Oncology*, 73(Suppl.2), 1-17, 2004
- [Wambersie 2009] A.Wambersie, P.Andreo, P.M.DeLuca, R.Gahbauer, J.H.Hendry, D.T.L.Jones, H.G.Menzel, G.Whitmore, Biological weighting of absorbed doses in particle-beam therapy: ICRU-IAEA recommendations on the isoeffect-dose concept, International Conference on Advances in Radiation Oncology, ICARO April 2009, IAEA, Vienna, CN-170, 324-325.
- [Wambersie 2010] A. Wambersie, D.T.L. Jones, J. Gueulette, R. Gahbauer, P.M. De Luca, What can we learn from the neutron clinical experience for improving ion-beam techniques and high-LET patient selection? *Radiation Measurements*, 45, 1374-1380, 2010
- [WHO 2000] C. Percy, A. Fritz, A. Jack, K. Shanmugarathan, L. Sobin, D.M. Parkin, and S. Whelan. World Health Organization, International Classification of Diseases for Oncology, 3rd edition (ICD-O3), 2000



Project co-funded by the European Commission within the FP7 (2007–2013)

Grant agreement no.: 228436

ULICE

Union of Light Centres in Europe

Project type: Combination of CP & CSA
Integrating Activities / e-Infrastructures / Preparatory phase

Start date of project: 1st September 2009 Duration: 48 months

D. JRA.WP7.3 - Services for data acquisition and processing

WP n° and title:	WP7 Common database and grid infrastructures for improving and catalysing access to RI for the broad European community
WP leader:	Jim Davies
Author(s):	Steve Harris, Charles Crichton, Jim Davies
Contributor(s):	ULICE collaborators
Pillar coordinator:	Richard Potter
Reporting period:	2 nd (1 st March 2011 to 31 st August 2012)

Dissemination Level		
PU	Public	
PP	Restricted to other programme participants (including the Commission Services)	
RE	Restricted to a group specified by the consortium (including the Commission Services)	
CO	Confidential, only for members of the consortium (including the Commission Services)	

TABLE OF CONTENTS

LIST OF ABBREVIATIONS AND DEFINITIONS	4
PUBLISHABLE SUMMARY	5
Deliverable D.JRA.7.3 Services for data acquisition and processing	6
REFERENCES	17

LIST OF ABBREVIATIONS AND DEFINITIONS

COTS – common off the shelf (software)

MDT – multi disciplinary team

COSD – cancer outcomes and services dataset

CR-UK – cancer research UK

CWT – cancer waiting times dataset

RTDS – radiotherapy data set

DID – Diagnostic Imaging Dataset

ICGC – International Cancer Genome Consortium

CDISC – Clinical Data Standards Interchange Consortium

ODM – Operational Data Model

CRF – Case Report Form

NCIN – (UK) National Cancer

RedCAP - Research Data Capture

HSDB – Human Studies Database

PTCRi – Particle Therapy Cancer Research Institute

CPT – Charged Particle Therapy

caDSR – Cancer Data Standards Repository

CTEP – Cancer Therapy Evaluation Program

IHTSDO – International Health Terminology Standards Development Organisation

SCT – Snomed CT

PUBLISHABLE SUMMARY

D.JRA.WP7.3 delivers key services for data acquisition and processing, supporting a pipeline where data gathered from clinical and research data sources are assembled and curated for analysis or regulatory reporting. The work package delivers

- a working methodology for gathering detailed datasets in the open source OpenClinica clinical trials management system together with patches required to overcome certain default behaviours that are obstacles in this application,
- a forms design service that supports the creation of OpenClinica – and potentially RedCAP – forms from standard question banks/variable registries such as caDSR leading to greater interoperability between clinical datasets,
- an evaluation of a current particle therapy protocol against current clinical data standards in support of better meta-analysis and makes recommendations about how international harmonisation of clinical protocols may practically be achieved, a
- a metamodel for Markov Cost Benefits analysis that will support the documentation and exchange of models, simulations and parameters so that the community can engage directly with health economic outcomes.

Deliverable D.JRA.7.3 Services for data acquisition and processing

Research requires information to be acquired and processed from any relevant source – be it clinical, pathology, radiotherapy treatment, patient sourced quality of life information, long term survival, recurrence and relapse records, or indeed other research studies. Deliverable 7.3 provides services and defines standards that may be applied to all scenarios to define data, generate software systems, enter, import and exchange clinical, demographic and research information in systems that may need to be validated for trial or public health use.

Hospital/Clinic data – records based research

For that data produced in the hospital/clinic we are beginning to see the kinds of information processing and electronic record keeping required for general health care. Common off-the-shelf (COTS) software is available from a number of companies purporting to support standards to varying degrees for all of the main activities in radiotherapy. However, the acquisition of information in highly personal workflows – such as in multi-disciplinary team (MDT) meetings – and cutting edge areas – such as genomic testing – remains a problem.

Most difficult is the routine acquisition of research quality data and its extraction into research data flows: the semantics of the data in the clinical record in situ is often poorly documented and where definitions exist they may not apply as fields have been *overloaded*. Overloading refers to the practice of ‘reusing’ columns in a database schema for a different, or narrower purpose than that intended, or to reserving certain numbers to indicate missing data. Deliverable D.JRA.7.1 described *metadata services* that may be used to document the specification of data models whose information is of interest to the researcher, and an early prototype of a service to document and generate form definitions and software suited for research. Deliverable D.JRA.7.2 provided foundational metadata necessary for the interoperation of clinical and clinical research data so that registration, treatment, adverse events and outcome could be better shared across the radiotherapy research community. For hospital acquired data, this work package has extended these tools into data acquisition and storage so that Demographic and MDT data may be acquired and stored as part of a departmental record for reporting and research, in systems that are sufficiently reliable for clinic use. Particularly it examines the collection of MDT data in two UK cancer clinics in Oxford and Cambridge and describes the services being developed to acquire and store that data to satisfy requirements for the new Cancer Outcomes and Services Dataset (COSD) that becomes mandatory in the UK in January 2012, and its supply to the Cancer Research UK (CR-UK) stratified medicines program for visualisation in the Oracle *Cohort Explorer* product. COSD is a far richer dataset than has previously been routinely collected in the UK and where collected to a high quality will provide real research value when linked to radiotherapy treatment plans.

The Cancer Outcomes and Services Dataset: automation using ULICE tools

COSD¹ is a substantial revision of the English NHS’ National Cancer Dataset, revising the core cancer registration dataset and adding site specific clinical and pathology data items, with the total number of data items rising from ... to 485². For radiotherapy research, there is extra data collected: facilities are included for the recording of image metadata and together with the Cancer Waiting Times dataset (CWT)³, and the developing Radiotherapy (RTDS)⁴ and Diagnostic Imaging Datasets (DID)⁵ provide a comprehensive record of intent and actual treatment for cancer in England. While actual images and plans are not submitted, sufficient metadata is collected to automate requests for such records.

¹ http://www.ncin.org.uk/collecting_and_using_data/data_collection/cosd.aspx

² <http://www.ncin.org.uk/view.aspx?rid=1348>

³ http://www.datadictionary.nhs.uk/data_dictionary/messages/clinical_data_sets/data_sets/national_cancer_waiting_times_monitoring_data_set_fr.asp?shownav=1

⁴ <http://www.canceruk.net/rtservices/rtds/home.htm>

⁵ <http://www.isb.nhs.uk/documents/isb-1577/amd-10-2011/1577102011spec.pdf>

Data Item No.	Data Item Section	Data Item Name	Data Item Description	Format	National Code	National code definition	Data Dictionary Element	Current Collection	Schema Spe
CORE - TREATMENT To carry the cancer treatment details. Multiple occurrences of this data group are permitted									
CR1340	CORE - TREATMENT	CANCER TREATMENT EVENT TYPE	The stage of treatment reached during a Cancer PATIENT PATHWAY for primary, recurrent or metastatic cancer.	an2	01	First Definitive Treatment for a new primary cancer	CANCER TREATMENT EVENT TYPE	CWT	Manda
					02	Second or subsequent treatment for a new primary cancer			
					03	Treatment for a local recurrence of a primary cancer			
					04	Treatment for a regional recurrence of cancer			
					05	Treatment for a distant recurrence of cancer (metastatic disease)			
					06	Treatment for multiple recurrence of cancer (local and/or regional and/or distant)			
					07	First treatment for metastatic disease following an unknown primary			
					08	Second or subsequent treatment for metastatic disease following an unknown primary			
					09	Treatment for relapse of primary cancer (second or subsequent)			
					10	Treatment for progression of primary cancer (second or subsequent)			
CR1370	CORE - TREATMENT	TREATMENT START DATE (CANCER)	This is the Start Date of the first, second or subsequent cancer treatment given to a PATIENT who is receiving care for a cancer condition.	an10 copy-mm-dd			TREATMENT START DATE (CANCER)	CWT	Manda
CR2040	CORE - TREATMENT	CANCER TREATMENT MODALITY	The type of treatment or care which was delivered in a Cancer Treatment Period	an2	01	Surgery	CANCER TREATMENT MODALITY	CWT	Manda
					02	Anti-cancer drug regimen (Cytotoxic Chemotherapy)			
					03	Anti-cancer drug regimen (Hormone Therapy)			
					04	Chemoradiotherapy			
					05	Teletherapy (Beam Radiation excluding Proton Therapy)			
					06	Brachytherapy			
					07	Specialist Palliative Care			
					08	Active Monitoring (excluding non-specialist Palliative Care)			
					09	Non-specialist Palliative Care (excluding Active Monitoring)			
					10	Radio Frequency Ablation (RFA)			
					11	High Intensity Focussed Ultrasound (HIFU)			
					12	Cryotherapy			
					13	Proton Therapy			
					14	Anti-cancer drug regimen (other)			
					15	Anti-cancer drug regimen (Immunotherapy)			
					16	Light Therapy (including Photodynamic Therapy and Psoralen and Ultra Violet A (PUVA) Therapy)			
					17	Hyperbaric Oxygen Therapy			
					19	Radioisotope Therapy (including Radioiodine)			

Figure 1: Excerpt from the COSD dataset for treatment reporting

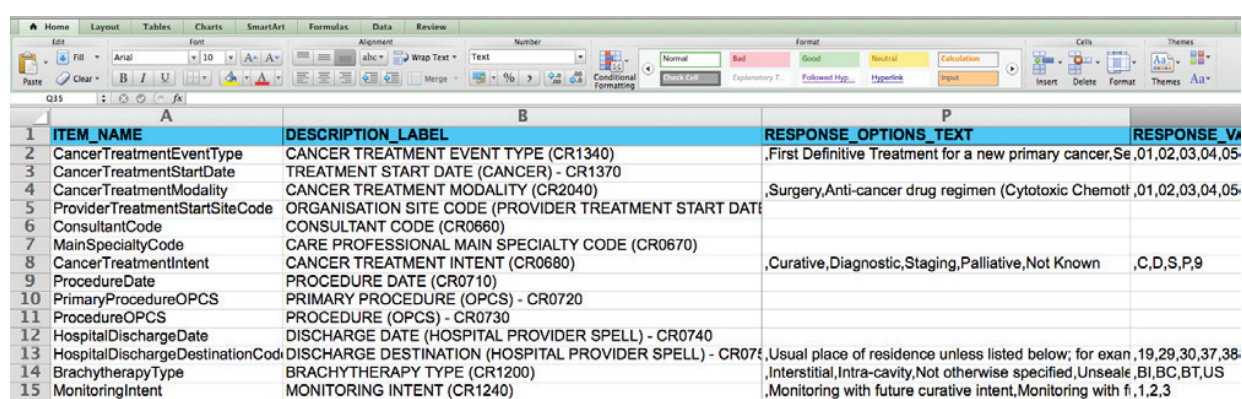
These datasets differ from previous registration and operational monitoring work in that they require electronic submission in XML format, and are intended to be exported from electronic systems rather than manually transcribed into a spreadsheet. However, the reports require the collation of information from several sources and thus in many locations a ‘staging area’ where data can be assembled, linkage validated and some minor curation work applied is necessary.

In Oxford, MDT reports are currently collected through the use of a Microsoft Word form and stored as Word documents. When correctly designed, Word can provide a usable forms environment and using Visual Basic for Applications it is possible to extract information from the documents for export into clinical and research systems – this is an approach adopted in Addenbrookes to enrich treatment plans with MDT data (see deliverable D.JRA7.4). However, in Oxford Haematology we have been developing Adobe PDF forms which provide a more stable, XML-ready method of gathering the data. XML data from the forms will be transformed with an XSLT into a single file in CDISC ODM format which can be imported directly into an OpenClinica⁶ staging area.

⁶ <https://community.openclinica.com/>

Batch loading data into OpenClinica presents problems our team have encountered previously supporting the International Cancer Genome Consortium (ICGC) Oesophageal Cancer group: for ULICE we have been able to further develop a patch to overcome what is currently default behaviour and thus automate the import of data into these clinical research databases. A common feature of clinical trial workflows is the signing of a case report form (CRF) as complete: if an OC dataset has even a single record marked as complete, the entire import transaction fails. Our patch is a custom import module that overrides this default behaviour and allows the import to over-write locked records which will be maintained until such a time as the central development team incorporates this functionality into the core distribution.

Importing data into a database of course presupposes a data structure capable of receiving the data, and further services have been developed to support the semi-automatic creation of these datastructures. OpenClinica supports the design of case report forms through their definition in Microsoft Excel, and creates suitable data structures to support these forms automatically: we have adapted our form design tool as detailed in D.JRA.WP7.1 to support the definition of OpenClinica CRFs from metadata elements held in either the metadata registry described in WP7.1 or from the US NCI caDSR.



ITEM_NAME	DESCRIPTION_LABEL	RESPONSE_OPTIONS_TEXT	RESPONSE_VALUES
CancerTreatmentEventType	CANCER TREATMENT EVENT TYPE (CR1340)	.First Definitive Treatment for a new primary cancer.	.01,02,03,04,05
CancerTreatmentStartDate	TREATMENT START DATE (CANCER) - CR1370		
CancerTreatmentModality	CANCER TREATMENT MODALITY (CR2040)	.Surgery,Anti-cancer drug regimen (Cytotoxic Chemot	.01,02,03,04,05
ProviderTreatmentStartSiteCode	ORGANISATION SITE CODE (PROVIDER TREATMENT START DATE		
ConsultantCode	CONSULTANT CODE (CR0660)		
MainSpecialtyCode	CARE PROFESSIONAL MAIN SPECIALTY CODE (CR0670)		
CancerTreatmentIntent	CANCER TREATMENT INTENT (CR0680)	.Curative,Diagnostic,Staging,Palliative,Not Known	.C,D,S,P,9
ProcedureDate	PROCEDURE DATE (CR0710)		
PrimaryProcedureOPCS	PRIMARY PROCEDURE (OPCS) - CR0720		
ProcedureOPCS	PROCEDURE (OPCS) - CR0730		
HospitalDischargeDate	DISCHARGE DATE (HOSPITAL PROVIDER SPELL) - CR0740		
HospitalDischargeDestinationCode	DISCHARGE DESTINATION (HOSPITAL PROVIDER SPELL) - CR074	.Usual place of residence unless listed below; for exan	.19,29,30,37,38
BrachytherapyType	BRACHYTHERAPY TYPE (CR1200)	.Interstitial,Intra-cavity,Not otherwise specified,Unseale	.BI,BC,BT,US
MonitoringIntent	MONITORING INTENT (CR1240)	.Monitoring with future curative intent,Monitoring with fi	.1,2,3

Figure 2: COSD Form definition in OpenClinica. ITEM_NAME has been changed to support export to XML

In this work, we have exported the definition of the COSD dataset from the source Excel file into XML and transformed this into the import format required by our metadata registry. The imported metadata set was then used to generate questions on COSD forms, standardising the design so that when a complete COSD dataset is assembled in an OpenClinica instance it may be viewed, curated and exported into a single ODM file. This ODM file is then transformed – again by XSLT – into the specific COSD format required by the National Cancer Intelligence Network (NCIN). Again, while the specific definitions and reporting requirements are of less interest outside of England, the general approach, the OpenClinica patches and the form design tooling and service are now a recipe that may be copied in any similar application of clinical data management. The form design tooling is of course of more general interest in the deployment of multi-centre protocols which is discussed below.

Services for form creation

The form design service described above provides robust tooling for an approach already developed as part of the UK CancerGrid project [1] and offered in prototypical form in D.JRA.WP7.1. We have previously worked upon the deployment of case report form (CRF) definitions into custom frameworks based upon JBoss/MySQL, against standard platforms such as SharePoint, and as generic XForms for deployment in the open source eXist XML database. However, in the last year two open source, free at the point of use clinical study management systems have become available. REDCap⁷ (Research Electronic Data Capture) is a secure web application for building and managing online surveys and databases aimed at the clinical research community. OpenClinica describes itself as ‘the world’s first professionally supported open source clinical trial software for Electronic Data Capture in Clinical Data Management’. Both solutions offer readily installable, high quality software that can be deployed across a developing clinical research network such as

⁷ <http://project-redcap.org/>

ULICE at minimal cost and with maximum utility [2]. Indeed, since it is possible to download a validated OpenClinica virtual machine image from the vendors⁸, almost no specialist IT knowledge is required to create a clinical research data management system for manual entry of data.

Both solutions have a common feature for the design of case report forms: the user employs an Excel spreadsheet to describe questions, sections and flow logic for the intended form and this spreadsheet can be loaded into the application for automatic deployment against the database. This allows domain experts to develop highly specific clinical research databases without extensive programming knowledge. Another common facility of the tools is ready export of study data in industry standard formats such as CSV, SAS, SPSS and CDISC ODM - adoption of either software does not restrict the options of the user.

We have developed a plugin for Microsoft Excel that allows the user to choose clinical variables from a metadata database such as the ULICE deployed Oxford Metadata Registry or the US Cancer Data Standards Repository to annotate spreadsheets for data capture. We have been able to customize this tool so that instead of annotating columns with the definition of the data they contain, it writes metadata definitions as *data* into the spreadsheet in the format OpenClinica requires to define forms. This allows a user to take a standard clinical variable made available from the ULICE metadata registry (MDR) and use them to create new, compliant forms that describe the intent of their clinical research. This eliminates transcription errors when using prose specifications of form designs by automating the process of creating form questions from previously defined metadata. Form questions may also be authored in the tool and registered in our OMR database: once the form is complete, model of the form as a simple, ordered collection of questions may be uploaded to the metadata registry together with the actual Excel Spreadsheet to support detailed study registration and form design reuse: more detailed registration will be supported as consensus on ISO19763-13 (Forms Metamodel) is achieved in ISO/JTC1/SC32/WG2 and between our research group and the NCICBIIT over the detailed metamodel of forms (see D.JRA.WP7.4, the revised tool is expected to be delivered in D.JRA.WP7.6).

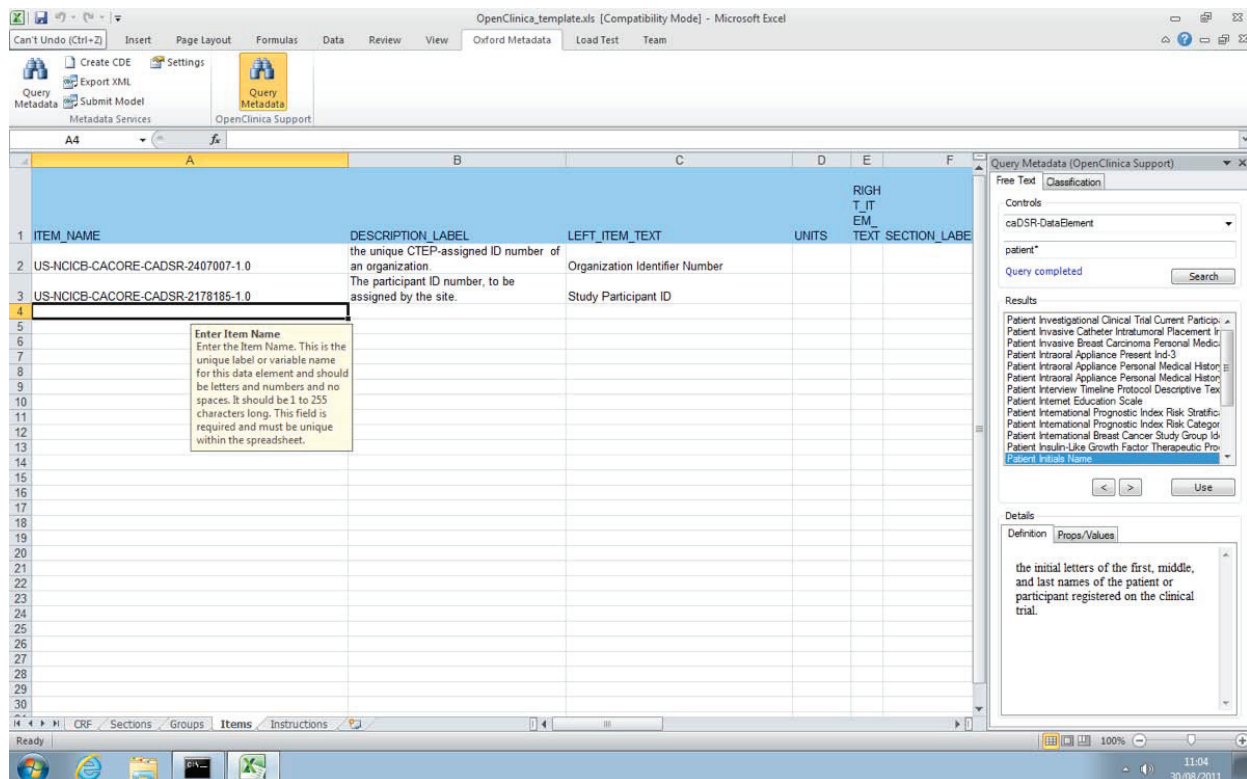


Figure 3: Creating questions in an OpenClinica form design

⁸ <https://community.openclinica.com/project/openclinica>

ITEM_NAME	DESCRIPTION_LABEL	LEFT_ITEM_TEXT	UNITS	RIGHT_ITEM_TEXT	SECTION_LABEL	HEA	GRO	LDER	SUBHEADER
US-NCICB-CACORE-CADSR-2407007-1.0	the unique CTEP-assigned ID number of an organization.	Centre ID			identification				
US-NCICB-CACORE-CADSR-2178185-1.0	The participant ID number, to be assigned by the site.	Participant ID			identification				
US-NCICB-CACORE-CADSR-2001039-4.0	the initial letters of the first, middle, and last names of the patient or participant registered on the clinical trial.	Initials			identification				
US-NCICB-CACORE-CADSR-2002741-4.0	Is the patient age 18 years or older	Is the patient age 18 years or older			inclusion_exclusion				
US-NCICB-CACORE-CADSR-2004073-4.0	Has written informed consent been obtained?	Has written informed consent been obtained?			inclusion_exclusion				
US-NCICB-CACORE-CADSR-2182072-1.0	Date of a process used in therapeutic trials or other research endeavors for allocating experimental subjects, human or animal, between treatment and control groups, or among treatment groups. Text designations that identify gender. Gender is described as the assemblage of properties that distinguish people on the basis of their societal roles. [Explanatory Comment 1. Identification of gender is based upon self-report and may come from a form, questionnaire, interview, etc.]	Randomization Date			inclusion_visit				
US-NCICB-CACORE-CADSR-2200604-3.0	the month, day and year on which the person was born	Gender			inclusion_visit				
US-NCICB-CACORE-CADSR-793-5.1		Date of Birth			inclusion_visit				

Figure 4: A completed form design annotated with metadata linking it to the registry

Figure 5: Case Report Forms generated for the Lyon/Heidelberg study

Ultimately, the workflow here will generate MDT reports pre-populated with background information gathered from the Trust's established data warehouse relating to diagnosis, imaging and pathology: the services described in D.JRA.WP7.4 will be further developed to validate the record linkage and ensure that correspondence of information by hospital number is correct before the MDT decides upon the therapy plan for the patient. Again revised versions will be made available in D.JRA.WP7.6.

Research data – reducing the cost and increasing the value of research

With the advent of cloud services, virtual machines and new software licensing models, the fixed costs of collecting quality research data have been significantly reduced. OpenClinica and RedCAP may simply be configured to support a particular study and space in a secure cloud – provided by the clinic, an associated university or a suitable commercial operator – leased as required. While much work remains to be done, data and metadata may be already electronically exchanged between installations and software implementations so there is no longer any pressing need for a strategic investment in traditional IT support for research data management. Using the form design service described above [see Services for form creation] one can record better metadata about a study increasing the value of the research data collected, and as described in D.JRA.WP7.2, if metadata definitions are shared between studies, then interoperable data can be collected.

Towards the development of standard protocol forms for Particle Radiotherapy

While the caBIG program made significant contributions to the development of clinical data standards relating to drug and biological agent development in the US through the Clinical Therapy Evaluation Program (CTEP)⁹, there remains the question of how applicable these standards are for European radiotherapy research, and where there are mismatches and gaps, how might they be addressed.

As a worked example, Oxford and Etoile collaborated in matching caBIG clinical data standards to a French Randomised study that compares CPT (delivered by Heidelberg) and the best X-Ray therapy available in France. As the protocol forms were developed, we attempted to locate corresponding data standards in the US Cancer Data Standards Repository (caDSR) so that we might comment on the feasibility of standardisation, reasoning that if correspondence between the needs of the study and caBIG standards could be established, then a minimum dataset for European CPT research and a set of standard protocol form templates would be readily achievable.

Although the comparison was made in the early stages of the development of the protocol, considerable overlap with CTEP standards was identified. 81 clinical variables were examined: 21 were radiotherapy specific and no matches could be found in caDSR, which was entirely expected given the focus on bioinformatics research in the caBIG community; 49 were non-radiotherapy specific variables for which usable matches could be found, of which 30 were exact. For the remaining elements, conceptually similar elements were found for all – however representation was country specific relating such as address fields and national organization approvals. The detailed analysis is given in Appendix 1.

Most of the missing, radiotherapy specific variables readily map onto concepts in the US RadLex terminology¹⁰ or the US National Cancer Institute Thesaurus¹¹, making the composition of well-defined variables relatively easy: however in terminology for diagnosis and specific anatomical structures, the vocabulary that the French team wished to use was difficult to reconcile with any single source of concepts. This will prove problematic: where terminologies support synonymy, any sibling terms to the term of interest contribute to our understanding of the meaning of that term, even if the sibling terms are not formally disjoint. Consequentially, selecting terms from several different terminologies to compose a value set for the site of the primary lesion makes comparison with other studies difficult unless the same value set is used. There are two solutions to this problem: we could choose to implement a standard terminology such as SNOMED CT and lobby through the International Health Terminology Standards Development

⁹ <http://ctep.cancer.gov/>

¹⁰ <http://www.radlex.org/>

¹¹ <http://ncit.nci.nih.gov/>

Organisation (IHTSDO) to ensure suitability to radiotherapy research, or develop a specific custom terminology with mapping – so far as is possible – to other clinical and research terminologies. This choice falls under the scope of other work packages. Working with IHTSDO offers better integration with clinical practice, but this may come at the cost of precision.

One further advantage of working with IHTSDO is that SCT offers inbuilt mechanisms for extension through structures for the creation of expressions so that one might represent research findings in future medical records. For instance, a ‘finding’ of consent on the recruitment form might be represented in a SCT clinical record as

```
243796009 | situation with explicit context|: {  
  246090004 | associated finding | =  
  203031000000107 | informed consent given |,  
  408731000 | temporal context | =  
  410584005 | current - time specified |}
```

Currently SCT is not capable of encoding all research observations: most questions on a CRF fall under a SCT expression pattern called ‘Observable Entity’, for which the expression composition rules have not been published. However, once such rules exist it will be possible to search SCT encoded clinical records for particular items of data, and to represent clinically relevant clinical study observations directly into a semantic medical record. Another advantage of the approach of D.JRA.WP7.1/7.2/7.4 is that mapping between common observable entities and CRF structures in the research domain may be standardized, stored and reused, reducing the cost to the research community of SCT adoption.

As a practical demonstration of the ability to reuse metadata from caDSR, harmonized versions of the form design were created with the form design tool and loaded into an OpenClinica instance – the screenshots in Figure 5 are from the import process previewing the generated form.

Study registration

The services above make a contribution to the collection of high quality interoperable data in support of CPT research. However, we require an evidence base for efficacy of CPT and consensus that it is cost effective. The highest quality of evidence comes from systematic reviews and meta-analyses of randomized controlled trials, frequently involving access to raw data on clinical trial participants. Access to this data is facilitated by requirements for the registration of randomized trials: in response to concerns that undisclosed clinical trials were introducing significant bias into reports of the efficacy of treatment, the ‘big four’ – the Lancet, the BMJ, NEJM and Nature – agreed not to accept papers reporting randomized controlled trials for publication if the study had not been registered with clinicaltrials.gov prior to recruitment of the first subject [2]. As a consequence, all randomized trials are registered in a single trial registry¹² and it becomes relatively easy to identify relevant studies.

However, it is clear both from the dearth of randomized studies in the literature, and from the opinions expressed at a PTCRi hosted workshop in August 2011 [4] that designing an interesting, ethical and successful randomized study in particle radiotherapy is more difficult than one would hope – there was sharp division amongst the delegates over the central question of equipoise between the best available X-ray based therapy and its particle equivalent. Proponents of particle radiotherapy believe that dose distributions are ‘so advantageous that it would be unethical not to offer CPRT to patients if it is available’ whereas others ‘express doubts as to whether the more targeted radiation dose distributions obtainable with CPRT are sufficient to alter clinical outcomes in many applications and so randomized trial comparisons with other forms of treatment are ethically justified’. Consequentially, much research is in the form of cohort studies – both retrospective and prospective – for which there is no registration requirement and thus no comprehensive registry.

¹² <http://clinicaltrials.gov/>

As the number of facilities grows, this exacerbates problems with transnational access – uniform registration of case series research protocols would provide another route to identify treatment options for their patients, and together with the metadata services described above facilitate multi-centre trials without significant cost. In order to ensure that the case for CPT is developed as rapidly as possible, it is essential that the European community of CPT centres publishes a register of all of its research protocols. This register will provide a focus for research and a portal through which statisticians can identify suitable data for analysis.

WP7 has been working with the US Human Studies Database group¹³ from the US CTSA program on developing a European version of their recommendations so that the register will be interoperable with US registers, we are also working on extending this standard to include the definitions of CRFs providing further information to statisticians about the suitability of data. Basic study registration is currently in early prototype and it is anticipated that it will be complete in time for presentation as part of D.JRA.WP7.5.

Services for Analysis

Previously in the report we have examined how *interoperable* research data can be gleaned from medical workflows and how it may be acquired in regular clinical trials using COTS software: we have made progress in the development of a European CPT studies register to facilitate access to research data for meta-analysis which will provide evidence of efficacy. What remains is to determine for which diseases CPT is cost effective, and worthy of the extra investment and cost they entail.

Markov models (MM) are used to model random processes that evolve over time and are frequently used to simulate disease progression pathways [4].

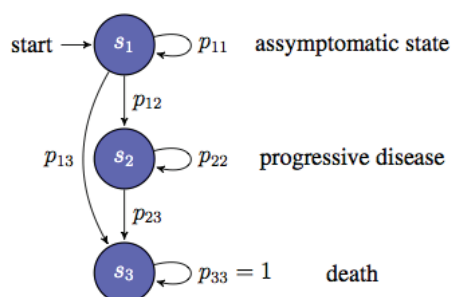


Figure 6: A Simple Markov Chain Model for Cancer

A finite number of mutually exclusive health states, $s_{(1...n)}$ (see Figure 7), are created that correspond to clinically and economically important events. Each state is associated with one or more costs incurred by a patient while occupying that state, a utility value corresponding to the quality of life experienced in that state, and probabilities, $p(s_a \rightarrow s_b)$, are assigned to transitions between related states. In a simulation, each patient from a population takes a random walk through the series of states, according to the state transition probabilities, accumulating costs and benefit until they reach the terminal state of the model. Simulations based upon differing interventions can then be compared to measure relative cost effectiveness. An example of a complete model, here for Prostate Cancer recurrence after radiotherapy is given in Figure 8

¹³ https://hsdbwiki.org/index.php/HSDB_Wiki

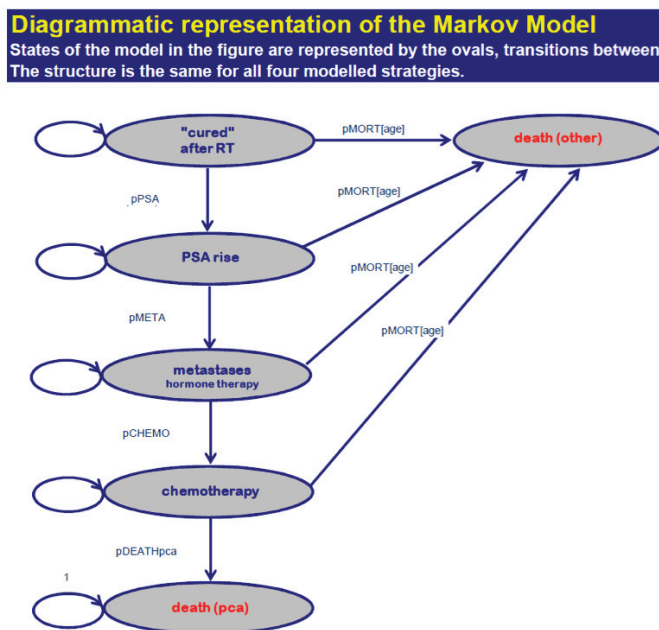


Figure 7: A Markov model for Prostate Cancer Recurrence

With greater capital costs and longer treatment planning times, CPT must be able to demonstrate a cost-effective improvement in quality of life – in diseases such as paediatric and prostate cancer – or a sufficiently longer life – ocular, skull base, para-spinal cancer – in order to be considered a viable option where there is an opportunity cost element to health care. The CPT community must engage with these models so that they can contribute better estimations of the parameters used in the analysis and understand which diseases could be brought into scope through – say – hypofractionation. Sensitivity analysis of models allows the community to concentrate on obtaining better estimates of critical values, or highlighting areas where improvement in protocols and reductions in costs can make significant improvements in cost-effectiveness [5]. Equally, while prostate cancer therapy may not be effective for England through the NHS, this may prove different in other healthcare models, or where the value of a quality adjusted life year is higher. With characterisation of cancer at the molecular level, personalised models may be possible, where a patient could set priorities between longevity and quality of life to obtain a better understanding to the implications of treatment options. To achieve these goals, we require an open and transparent method for the communication of cost-benefit models.

Sharing partial Markov cost benefits models

We have developed a modular metamodel for Markov cost-benefit studies that standardises the representation and communication of particular Markov models. Instance models can be published as a whole so that simulations can be discovered, validated, repeated and transferred between different execution engines, or elements of a simulation can be individually reused in new models. For example, one could reuse states and transition probabilities for treatment and progression in prostate cancer accepted by a community, loading in local cost, utility and mortality probabilities to model implementation in a particular health care environment, one could change certain transition probabilities in the state diagram based upon better estimates of relative biological effect, local control, malignant induction and adverse event likelihood, or one could revise costs based upon the introduction of automatic image segmentation, hypofractionation or technical improvements leading to more rapid turnaround of treatment rooms.

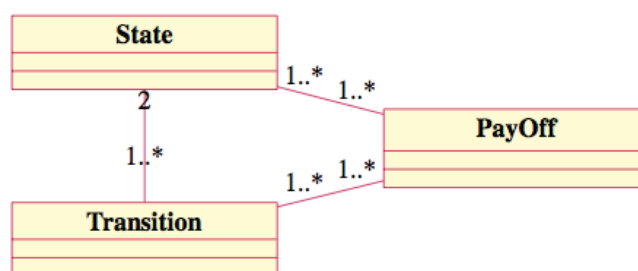


Figure 8: A simple metamodel for Markov health economic models

Figure 8 illustrates the characteristics of a Markov model. Every Markov model has a number of states linked by transition probabilities that apply between exactly 2 states: transitions from a state to itself are permitted. Every transition and every state can have associated payoffs. A payoff could be a type of cost or quality adjusted lifetime, several payoffs typically contribute to the overall payoff of the same type, e.g. total costs (at the end of a single simulation) are constituted by (the sums of) intervention cost, follow-up costs and secondary treatment costs each summed over the whole simulation.

Transition probabilities and payoffs require numeric estimations corresponding to the cycle length of the simulation: for instance, an estimate for the probability of death or for the cost incurring from a particular side effect that a patient might be suffering. These estimations are ideally obtained from comparative studies, or meta-analyses, but are often expert estimations or parameters drawn from a statistical distribution in sensitivity analysis.

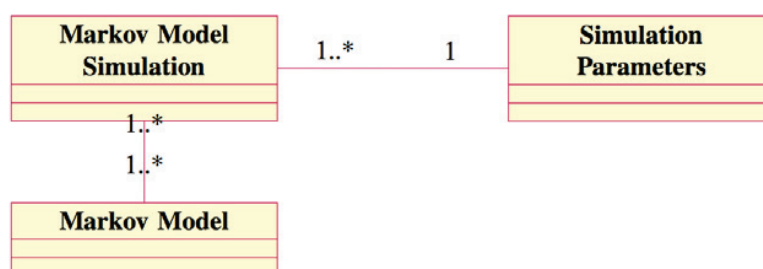


Figure 9: Simulation package

Figure 9 shows how simulations relate to models. A simulation yields results about relative cost-effectiveness between different scenarios/strategies based on comparing the results of several models that have been evaluated according to a set of simulation parameters (evaluation method (deterministic, stochastic; individual, cohort), the duration of the simulation (cycle number), possible corrections (half-cycle correction), the size of the simulated population, etc. A model can be re-used in multiple simulations, producing results appropriate to different contexts.

The model is available in the Eclipse Modelling Framework 'ecore' format for the generation of software artefacts, in W3C XML Schema for document definition and exchange and as a domain specific language (DSL) developed in Spoofox¹⁴.

The full meta-model is given in Figure 10, an implementation in Matlab is planned from the related FP7 PARTNER project. Continuing engagement with the Health Economics team in the Maastric Clinic will ensure this model meets practical requirements.

¹⁴ <http://strategoxt.org/Spoofox>

REFERENCES

- [1] J. Davies, J. Gibbons, S. Harris and C. Crichton, "The CancerGrid Experience: ~~Model-Driven~~ Model-Driven Engineering for Clinical Trials," *Science of Computer Programming*, vol. in press, 2012.
- [2] E. Smeets and G. Visser, "OpenClinica's (low cost) eCRF, an Investigator-Initiated Study's Showcase," *Applied Clinical Trials*, 8 June 2011.
- [3] C. DeAngelis, J. Drazen, F. Frizelle, C. Haug, J. Hoey, R. Horton, S. Kotzin, C. Laine, A. Marusic, A. Overbeke, T. Schroeder, H. Sox, M. Van Der Weyden and I. C. o. M. J. Editors, "Clinical Trial Registration: a statement from the International Committee of Medical Journal Editors," *JAMA*, vol. 292, no. 11, pp. 1363-4, 2004.
- [4] M. Sheehan et al, "Consensus Statement on Ethics, Equipoise and Research on Charged Particle Radiation Therapy," *BMJ*, p. in press.
- [5] A. Briggs and M. Sculpher, "An introduction to markov modelling for economic evaluation.," *Pharmacoeconomics*, vol. 13, no. 4, pp. 397-409, 1998.
- [6] J. Janneke, P. Grutters, M. Pijls-Johannesma, D. De Ruyscher, A. Peeters, S. Reimoser, J. Severens, P. Lambin and M. Joore, "The cost-effectiveness of particle therapy in non-small cell lung cancer: Exploring decision uncertainty and areas for future research," *Cancer Treatment Reviews*, vol. 36, no. 6, p. 468-476, 2010.

Appendix 1: Analysis of CRF design

	Proposed Question	Value domain	Candidate question(s) from caDSR – URL links to caDSR entry	M = match; C = conceptual match; N = near match; X = no match	Comments
1 Randomisation/on study: Patient Identification					
1.1	Centre ID	Identifier (text)	Participating Organization ID , Organization ID number	C	No direct match, Queried with Dianne Reeves. They have suitable definitions in CTEP but they are overly specific
1.2	Patient ID	Identifier (text)	Subject No. Study Participant Identifier	M	Exact match. Fulfils D.MGT/JRA/NA/TA 7.2 table 3 question 1
1.3	Initials	Text	Participant initials	M	Exact match.
2 Randomisation/on study: Review of Inclusion and Exclusion Criteria					
2.1	CoMÉTHE agreement	Y/N	(no match)	X	France specific data element
2.2	Acceptable delay of treatment (delay to be defined)	Y/N	(no match)	X	
2.3	Age > 18 years	Y/N	Age >= 18 years	M	Exact match
2.4	Signed informed consent	Y/N	Has written informed consent been obtained?	M	Exact match
3 Randomisation/on study: Inclusion visit					
3.1	Inclusion date (= randomisation date)	Date: dd/mmm/yyyy	Randomization Date Enrollment date	M	Exact match on randomisation data. American format date for 'Enrollment Date' (sic). Fulfils D.MGT/JRA/NA/TA 7.2 table 3 question 2
3.2	Sex	M/F	Patient gender	N	Value domain also includes 'unknown' and 'unspecified'

	Proposed Question	Value domain	Candidate question(s) from caDSR – URL links to caDSR entry	M = match; C = conceptual match; N = near match; X = no match	Comments
3.3	Date of Birth	Date: dd/mmm/yyyy	Patient's Date of Birth	N	Partial match: American date format - need one that is used in France/Europe.
3.4	ECOG performance status	0/1/2/3/4	Performance Status (ECOG) ECOG Performance Status	M	Includes a 'Dead' status. Obviously not appropriate for prospective trial. Need to clarify which is preferred for our application
3.5	Weight	Number (kg)	Body Wt (Kg) (most widely used exact match)	M	The standard elements are a weight number and enumeration for the units: Patient weight ; Weight unit of measure
3.6	Smoking status	Smoker / ex-smoker / never smoked	Smoking History	N	Close match: a little more complicated, ex-smokers are subdivided into those who have stopped smoking >15 years ago
3.7	History of cardiovascular disease (coronary artery disease, MI, stroke, peripheral arterial disease)	Y/N	Cardiac	N	Should be checked: definition is 'yes/no/unknown indicator that asks whether there was a history of cardiac comorbidities'.
3.8	Diabetes	Y/N	Diabetes	M	The caDSR definition is slightly confused because it is generated from the concepts that annotate the variable. The 'approved question texts' are much more indicative of its intent.
4 Randomisation/on study: Tumour site and type					
4.1	Adenocystic carcinoma (RID4227) primary site	Parotid (RID28744); Submandibular Gland (RID9968); Sublingual gland (RID9963); Accessory salivary glands - palate (RID9960); Accessory salivary glands - nasopharynx; Accessory salivary glands - sinus; Accessory salivary glands - larynx/trachea; Lacrymal Gland (RID9761); other	(no match)	X	Analysed according to Radlex and NCI. Note mix of concepts: neither terminology had all terms
	Adenocystic carcinoma primary site (other)	Text	(no match)	X	

Proposed Question	Value domain	Candidate question(s) from caDSR – URL links to caDSR entry	M = match; C = match; N = near match; X = no match	Comments
4.2 Adenocystic carcinoma extension	Perineural (RID5237?); Base of skull (RID28731); Bone (other than base of skull); Lymph nodes (RID13296); Meninges (RID7091); Brain	(no match)	X	
4.3 Sarcoma histopathology	Liposarcoma (NCIt:C3194); Inflammatory myofibroblastic tumor (NCIt: C6481); Fibrosarcoma; Pleomorphic malignant fibrous histiocytoma (MFH) / Undifferentiated pleomorphic sarcoma; Leiomyosarcoma; rhabdomyosarcoma; Kaposi sarcoma; Angiosarcoma; Malignant peripheral nerve sheath tumor; Synovial sarcoma; Ewing tumor; Desmoplastic small round cell tumor; gastro-intestinal stromal tumors (GIST); Chondrosarcoma; Osteosarcoma; Malignant fibrous histiocytoma; Ewing sarcoma / PNET; Chordoma; Langerhans cell histiocytosis	(no match)	X	
4.4 Sarcoma primary site	Limb; Limb (soft tissue/bones); Limb girdle (soft tissues/bones); Thorax (soft tissues/chest/dorsal spine); Abdomen (soft tissues/lumbar spine); Pelvis (soft tissues/bones); Head and neck (soft tissues/bones); Retroperitoneum; Viscera	(no match)	X	
4.5 Sarcoma tissues involved	Skin; Subcutaneous adipose tissue; Muscle; Bone; Joint; Major neurovascular bundles; Attached organs	(no match)	X	
5 Randomisation/on study: Tumour characteristics				
5.1 (Disease status)	Primary / recurrent	Disease Status	N	Value domain includes the target terms, but has more options
5.1.1 If recurrent, number of recurrences	Whole non-negative number	Number of Relapses or Recurrences	M	Exact match
5.2 CIM (ICD) 10	Text	ICD-10 Code	M	Exact match
5.3 FNCLCC Grade	Grade 1: total score 2 or 3; Grade 2: total score 4 or 5; Grade 3: total score 6 to 8; NA (for bone tumours)	(no match)	X	

Proposed Question	Value domain	Candidate question(s) from caDSR – URL links to caDSR entry	M = match; C = conceptual match; N = near match; X = no match	Comments
5.4 Tumour size	Non-negative decimal (cm)	Malignant Neoplasm Longest Dimension Value	N	Initial largest dimension on 3d imaging
5.6 TNM Grade	Text	Disease Assessment TNM Classification Text Disease Assessment TNM Classification Type		as defined in the 7th edition of the TNM Guidelines according to the site of cancer. Fulfils D.MGT/JRA/NA/TA 7.2 table 3 question 4
6 Randomisation/on study: previous treatment for recurrent disease				
6.1 Chemotherapy	Y/N	Prior chemotherapy	N	Need to check all these definitions to ensure they match header
6.2 Surgery	Y/N	Previous Surgery Related to Primary Tumor	M	
6.3 Radiotherapy	Y/N	Prior radiation therapy for current study cancer	M	Confusion here - question text and definition inconsistent
6.4 Other treatments	Y/N	Prior other systemic therapy	M	
6.4.1 Specify other treatment	text	Specify other treatment type for the prior disease	M	
7 Randomisation/on study: Previous treatment of the present tumour				
7.1 Number of cycles of chemotherapy	Non negative integer	Chemotherapy Total Cycle Complete Count	M	
7.2 Surgery	No / R0 / R1 / R2	Margins of surgical resection	N	Variable includes RX and R0.5

Proposed Question	Value domain	Candidate question(s) from caDSR – URL links to caDSR entry	M = match; C = conceptual match; N = near match; X = no match	Comments
		Surgical Margin Resection Status		
7.2.1	Surgery date	Date (dd-mmm-yyyy or yyyy-mm-dd)	Primary Surgery Prior Performed Date	M
7.2.2	Surgical procedure	Intra-lesional Resection <i>Leaving gross tumor behind. Partial debulking or curettage are examples. In general, these procedures are palliative.</i> Marginal Resection <i>Removing the tumor and its pseudocapsule with a relatively small amount of adjacent tissue. There is no gross tumor at the margin; however, microscopic tumor may be present. Note that occasionally, a surgeon will perform an "excisional" biopsy, which effectively accomplishes the same thing as a marginal resection.</i> Wide Resection <i>An intracompartmental resection. The tumor is removed with pseudocapsule and a cuff of 2 cm of normal tissue in all directions, but without the complete removal of an entire muscle group, compartment or bone. A cuff larger than 2.0 cm is typical, but may be less when the margin is a fascial plane.</i> Segmental / En Block Resection (Bone Only) <i>This is similar conceptually to a wide excision in soft tissue. A single piece of bone is resected, including the lesion and a cuff of normal bone.</i> Radical Resection <i>The removal of an entire soft tissue compartment (for example, anterior compartment of the thigh, the quadriceps) or bone, or the excision of the adjacent muscle groups if the tumor is extracompartmental. Radical excisions include amputations and disarticulations.</i>	(no match)	X
7.2.3	Surgical margins	Intralesional (positive); marginal (<2cm of normal tissue around all margins, less if bounded by fascia); wide (>2cm of normal tissue around all margins, less if bounded by fascia)		X
7.3	Radiotherapy	Y/N	Has the patient received radiation therapy?	M Exact match

Proposed Question	Value domain	Candidate question(s) from caDSR – URL links to caDSR entry	M = match; C = conceptual match; N = near match; X = no match	Comments
7.4 Other treatments	Y/N	(no match)	X	Will refer to Dianne Reeves - should be a match
7.5 Specify other treatments	Text	Other, specify	M	Exact match
7.6 Reason for incomplete surgical resection	local extension; Surgical contra- Patient's refusal	(no match)	X	
8 Quality of life form (inclusion, treatment, 6 month, 18 month, end of study visit)				
	EQ-5D/SF-8			Enquire with US as to status of forms: probably do not need to specify unless specialised
8.1 EuroQoL questionnaire completed	n.a; not completed (illness); not completed (institutional error); not completed (other); not completed (can't contact patient); not completed (patient refused); questionnaire completed, form attached	EuroQoL Complete Indicator		For possible inclusion on associated case report form
9 Treatment form (to be entered at the end of treatment)				
9.1 Radiotherapy Modality	Photon only (http://www.cancergrid.org/279639); Proton only (http://www.cancergrid.org/872404); Photon and Proton; Carbon ion only (http://www.cancergrid.org/313150); Carbon ion and photon	(no match)	X	
9.2 Photon radiotherapy technique	Conventional external beam radiation therapy (2DXRT) (http://www.cancergrid.org/851457); 3-dimensional conformal radiation therapy (3DCRT) (http://www.cancergrid.org/706779); Stereotactic radiation therapy (SRT) (http://www.cancergrid.org/450633); Static/dynamic Intensity-modulated radiation therapy (IMRT) (http://www.cancergrid.org/679790); Helical tomotherapy (TOMO) (http://www.cancergrid.org/80133); Intensity-modulated arc therapy (IMAT)	(no match)	X	multiselect

Proposed Question	Value domain	Candidate question(s) from caDSR – URL links to caDSR entry	M = match; C = conceptual match; N = near match; X = no match	Comments
(http://www.cancergrid.org/98765);				
9.3	Photon radiotherapy equipment	Conventional LINAC; Robotic radiosurgery system; Gamma knife system; Tomotherapy	X	
9.4	Photon Radiotherapy: sequencing	Sequential/Simultaneous Boost Integrated	(no match) X	Concepts added to radiotherapy.owl
9.5	Particle (Proton / Carbon ion) radiotherapy technique	Passive scattering; Active scattering	(no match) X	Concepts added to radiotherapy.owl
10	Treatment form: treatment characteristics (one table for photon; proton, carbon)			
10.1	Delivered dose	Number (Gy)	X	
10.2	If combined, technique	As 9.2	X	
10.3	Target volume	Gross tumour volume; High risk CTV; Intermediate risk CTV; Low risk CTV	(no match) X	Cross tabulated against previous elements
10.4	Dose per fraction	Number (Gy)	RT Dose per Fraction Dose per fraction unit of measure	A
10.5	No of fractions	Non-negative integer	Total Number of Fractions	A
10.6	Treatment Duration	Days	Total Number of Treatment Days	A
11	Treatment form: Margins			
11.1	CTV to PTV margin	Number (mm)	(no match) X	One line each for each technique

	Proposed Question	Value domain	Candidate question(s) from caDSR – URL links to caDSR entry	M = match; C = conceptual match; N = near match; X = no match	Comments
12	Treatment planning data (one table)				
12.1	Tumour volume	Number (ml)	Total tumour volume	M	Exact match
12.2	Dose 2% (maximum dose)	Number (Gy)	(no match)	X	
12.3	Dose 50% (average dose)	Number (Gy)	(no match)	X	
12.4	Dose 98% (minimum dose)	Number (Gy)	(no match)	X	
12.5	Target volume	Gross tumour volume; High risk CTV; Intermediate risk CTV; Low risk CTV; High risk PTV; Intermediate risk PTV; Low Risk PTV;	(no match)	X	Cross tabulated against previous elements. Extension of 12.3
12.6	Treatment dose achieved as planned	Y/N	(no match)	X	
12.7	Reason for failure to complete treatment	Side effects; consent withdrawal; technical failure; other	(no match)	X	
12.8	Reason for failure to complete treatment (other) text	Text	(no match)	X	
13	Treatment: Adverse Events during treatment phase				
13.1	Symptom		CTC Select AE	M	Exact match - lots of terms though - may need to narrow this down
13.2	Grade		Adverse Event Grade	M	Exact match

Proposed Question	Value domain	Candidate question(s) from caDSR – URL links to caDSR entry	M = match; C = conceptual match; N = near match; X = no match	Comments	
13.3	Linked to treatment	Related to Study Treatment	M	Exact match	
13.4	Serious	Y/N Serious	M	Exact match	
14					
Follow up					
14.1	Follow-up interval	12 months; 24 months; 36 months; 48 months; 60 months;	M	TCGA FU Form question 1	
14.2	Control of tumour	Complete response; Partial response; Stable disease; Progressive disease	Several potential matches, but no radiotherapy specific: Overall Lesion Response Status 2188874 1.0; Overall Treatment Response Type 2187835 1.0; Primary Therapy Outcome Success Type 2786727 2.0; Target Lesion Response Status 2188860 1.0; Tumor Response CDUS Type 2178525 2.0; Follow-up Assessment Outcome Success Therapy Outcome Type 3104050 1.0	N	Can derive TCGA FU Form question 2 from this
14.3	Date of progression	Date - probably implemented as individual year/month/day fields so imprecise values can be recorded	M	TCGA FU Form 2897018; 2897014; 2897016	
14.4	Tumour recurrence	Local (in radiation field) Regional (out of radiation field) Metastasis	Location of relapse Metastasis Status	Combination of variables may suffice - can derive answer to TCGA FU form question 2.2	
14.5	Date of recurrence	Date - probably implemented as individual year/month/day fields so imprecise values can be recorded	M	TCGA FU Form 2897008; 2896991; 2897006	
14.6	Date of last contact	Date - probably implemented as individual year/month/day fields so imprecise values can be recorded	M	TCGA FU Form 2897024; 2897020; 2897022	
14.7	Date last known alive	Date - probably implemented as individual year/month/day fields so imprecise values can be recorded	M	TCGA FU Form 5.1,5.2,5.3	

	Proposed Question	Value domain	Candidate question(s) from caDSR – URL links to caDSR entry	M = match; C = conceptual match; N = near match; X = no match	Comments
14.8	Vital status at date of last contact	Living; Deceased	2190384		TCGA FU Form question 6
14.9	Date of death	Date - probably implemented as individual year/month/day fields so imprecise values can be recorded	2897030; 2897026; 2897028		TCGA FU Form 8.1,2,3
14.10	Performance Status (ECOG)	0/1/2/3/4	Performance Status (ECOG) ECOG Performance Status		Includes a 'Dead' status. Obviously not appropriate for prospective trial. Need to clarify which is preferred for our application
14.11	Weight	Number (kg)	Body Wt (Kg) (most widely used exact match)	N	The standard elements are a weight number and enumeration for the units: Patient weight ; Weight unit of measure
15 Adverse events since last visit					
15.1	Adverse event type	Text	CTC Select AE	M	Exact match - lots of terms though - may need to narrow this down
15.2	Adverse event grade	0/1/2/3/4/5	Adverse Event Grade	M	Exact match
15.3	Linked to study treatment	Y/N	Related to Study Treatment	M	Exact match
15.4	Adverse event serious	Y/N	Serious	M	Exact match
15.5	Secondary malignancy	In field; Out of field	(no match)	X	



Project co-funded by the European Commission within the FP7 (2007–2013)

Grant agreement no.: 228436

ULICE

Union of Light Centres in Europe

Project type: Combination of CP & CSA
Integrating Activities / e-Infrastructures / Preparatory phase

Start date of project: 1st September 2009 Duration: 48 months

D.[NA 9.1] - Report on scientific and technical aspects of the existing and planned infrastructures, on demographic and geographic aspects of the European facility distribution and on clinical criteria of eligibility for Hadron-therapy

WP n° and title:	WP 9 - Recommendations for further improvement and investments of the current and future Hadron Research Infrastructures
WP leader:	Roberto Orecchia
Author(s):	Roberto Orecchia Piero Fossati Cristina Bono
Contributor(s):	Guillaume Vogin
Pillar coordinator:	Manjit Dosanjh
Reporting period:	1

Dissemination Level		
PU	Public	X
PP	Restricted to other programme participants (including the Commission Services)	
RE	Restricted to a group specified by the consortium (including the Commission Services)	
CO	Confidential, only for members of the consortium (including the Commission Services)	

TABLE OF CONTENTS

LIST OF ABBREVIATIONS AND DEFINITIONS	4
1 Introduction	5
2 Demographic and geographic considerations	6
3 EXISTING AND PLANNED FACILITIES	10
4 CANCER EPIDEMIOLOGY IN EUROPE	17
5 PATIENTS ELIGIBLE TO HADRON THERAPY	18
6 Conclusions	20
7 References	20

LIST OF ABBREVIATIONS AND DEFINITIONS

GDP: Gross Domestic Product

1 Introduction

The European Union is composed of 27 member states and has an overall population of almost 500 million inhabitants. The following analysis will be limited to the 27 member states plus Switzerland. The ULICE project has a strong focus on ion beam hadrontherapy. It must be noted however that relative roles and indication of ions hadrontherapy and protons hadrontherapy are still a matter of debate; moreover, whereas there are many facilities that provide only protons hadrontherapy, all existing and planned European ions hadrontherapy centres will be dual facilities capable of delivering both ion and proton beams. The present analysis will therefore include both protons and ions facilities.

Hadrontherapy is used, almost exclusively, in the treatment of cancer (a significant exception is the treatment of brain artero-venous malformation, other more experimental non neoplastic indication may be neo-vascular glaucoma and functional ablation of epileptogenic foci). Knowledge of cancer epidemiology in Europe is a fundamental prerequisite in order to attempt a rational planning of future facilities. Incidence and mortality rate are of course relevant parameters. Incidence of new cancer cases is the basis to quantify the potential basin of people that could benefit from hadrontherapy.

Hadrontherapy is a very advanced kind of treatment. It has been shown to be extremely effective in the cure of selected types of cancer. There is the very reasonable hope that hadrontherapy will be able to further decrease cancer mortality (without of course changing cancer incidence). For a rational planning it is mandatory to consider incidence and mortality together. Hadrontherapy has been available only for a small minority of European cancer patients so far, its impact on cancer mortality can be considered hitherto minimal. It is well known that regarding cancer mortality Europe is not yet homogeneous and mortality rates are lower in the 15 western countries constituting the original core of the European Union as compared to the most recent members. Within this framework it is important to consider that the role of hadrontherapy must be inserted in a more comprehensive public health strategy to avoid the risk of having a “cathedral in the desert” with minimal benefit for the population.

Hadrontherapy centres require massive financial initial investments. Most quantitative analysis have shown that hadrontherapy can be cost effective; in the long term, considering the long lifecycle of particle accelerators, it can be not only cost effective but actually quite cheap. Anyway the capital cost is limiting the proliferation of new facilities. It is of some interest to correlate in different countries the number of facilities with basic economic indicators such as the gross domestic product (GDP). Moreover it is of great interest to understand the reimbursement policy. A thorough investigation of treatment cost and reimbursement through public and or private insurances in all European countries is well beyond the scope of the present project. Reimbursement policy in active facilities will be considered.

Indications for protons and ions hadrontherapy are still a matter of debate. In the present document three scenarios will be considered: a conservative one in which only indications that have either a high level of evidence or a well established practice or an extremely strong rationale will be considered; a practical one in which indications will be derived from the *status quo* of diseases treated in active facilities; and a limit one in which also cancer potentially treatable with hadrontherapy (according to single experts evaluation or scientific societies estimates) will be considered.

2 Demographic and geographic considerations

The European Union is composed of 27 members states that differ significantly in terms of surface population and resources. More than half of the total population resides in the 4 most populous states (Germany, France, United Kingdom and Italy). Considering 30 millions of inhabitants as a cut-off value, two more countries can be added to these four (Spain and Poland) for a total of about 350 Millions. The remaining 150 Millions inhabitant are distributed in 21 medium and small countries.

Country Name	Population (Millions) ¹	Active hadron-therapy facilities (protons)	Planned hadron-therapy facilities (protons)	Active hadron-therapy facilities (ions)	Planned hadron-therapy facilities (ions)	Gross domestic product (Billions €) ²	Population below 14 years of age (Millions) ³
Austria	8,3		Yes(1)		Yes(1)	284	1,24
Belgium	10,7					352	1,81
Bulgaria	7,6					36	1,03
Cyprus	0,8					17	0,14
Czech Republic	10,5		Yes (3)			146	1,50
Denmark	5,5					235	1
Estonia	1,3					15	0,2
Finland	5,3					180	0,88
France	64,3	YES (1)	Yes (2)		Yes(2)	1948	11,9
Germany	82	YES (3)	YES (4)	Yes(1)	Yes(2)	2499	11
Greece	11,2					230	1,61
Hungary	10					98	1,47
Ireland	4,5					154	0,96
Italy	60	YES (1)	YES (3)		YES (1)	1549	8,46
Latvia	2,3					18	0,32
Lithuania	3,3					27	0,5
Luxembourg	0,5					40	0,09
Malta	0,4					6	0,06
Netherlands	16,4					591	2,9
Poland	38,1		Yes (1)			354	5,8
Portugal	10,6					173	1,6
Romania	21,5					122	3,27
Slovakia	5,4					66	0,82
Slovenia	2					36	0,28
Spain	45,8					1063	6,82
Sweden	9,2	Yes(1)				346	3
United Kingdom	61,7	Yes(1)	Yes (1)			1698	10,8
Switzerland	7,8	YES(1)				396	1,19

Table 2.1: Overview of demographic and economic data in the EU in 2010

Not surprisingly there is an evident correlation between number of inhabitants and number of hadrontherapy facilities (considering the total number of existing and planned protons and ions facilities as a gross indicator). Examining table 2.2 it is possible to notice a general trend. No country with less than 5 million inhabitants has active or planned facilities. All the four biggest countries have active facilities and plans to build multiple new ones. Spain, the fifth biggest country in the union, with a GDP *pro capite* only slightly below the European average has no active facility and no known project to build any in the near future and can be considered as an abnormality in the above stated trend.

Considering medium size countries, between 5 and 25 million inhabitants, it is instead rather difficult to find a general pattern. Countries with a high GDP *pro capite* like Switzerland, Austria and Sweden have running or planned facility but also countries with GDP *pro capite* below the UE average have project to build facilities (1 in the Czech Republic and 2 in Slovakia). On the other hand neither Belgium nor the Netherlands, that are among the richest medium size states in the Union and both above 10 million inhabitants, have any known plan to build hadrontherapy facilities.

To take the discussion to a practical plan, we can also make a relation between the GDP and the number of facilities in the several EU states. According to the expectations, the countries with higher gross domestic product have the higher number of facilities or, it is better to say, have the availability of a hadron facility. The clearest example is Germany with the highest gross domestic product and something like 4 facilities, 1 treating patients the other near to that. With this affirmation due to a simple evidence based comment, we have reached the core of the problem concerning the spreading of the hadrontherapy, despite of its efficacy in the fight against tumors. We would state the obvious saying that an important investment such as an hadron facility can be faced where the financial situation is solid and a big part of the internal richness can be devoted to the applied research. Hadron therapy facilities require high capital and high operating costs respect to the conventional RT facilities.

Then, as for a matter of time, we could update the above table as for the line of Germany: we all get to know the decision by Siemens, the managing society of the PTZ Marburg facility, that for financial issues decided to freeze the Center when it was quite close to start treating patients. Up to now, the PTZ has been bought again by Siemens with the aim, for the period 2012 – 13, of leading a research and development programme in order to optimize furtherly the all system. The Kiel project's too has been suspended waiting for the results of such a research programme. It has been confirmed by Siemens, on the contrary, the implementation of a similar facility in Shanghai, planned start of the activities in 2014. It is important to underline anyway the main reason of such decision that seems to be related just to financial evaluations.

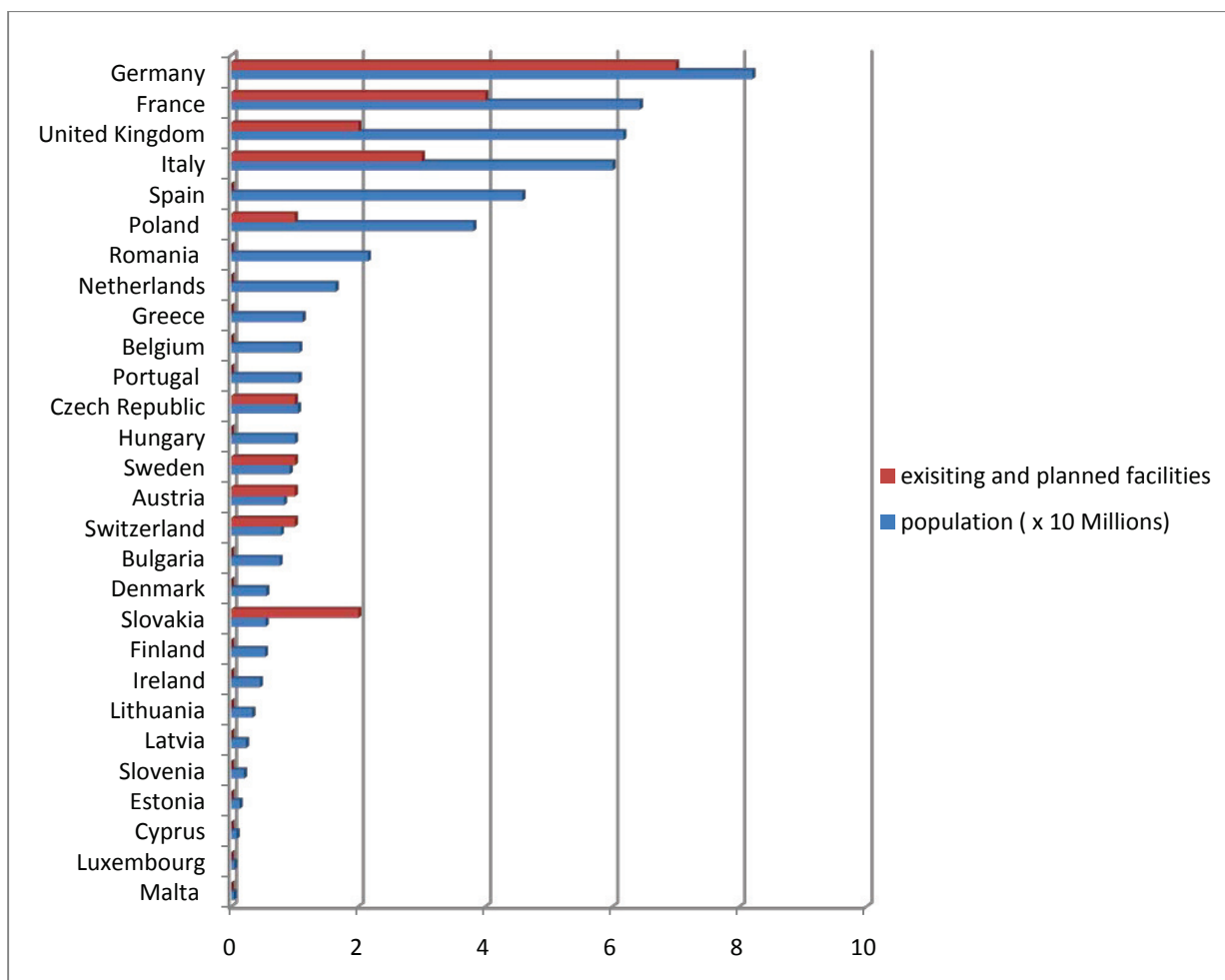


Table 2.2: correlation between population and number of hadrontherapy facilities

As will be discussed in more details in the next chapters, pediatric solid cancer is one of the strongest indications for proton hadrontherapy. It is therefore of interest to analyze the age group 0-14 years. Among the countries with more than 2 million children (0-14 years of age) only three do not have any hadrontherapy project: Spain, the Netherlands and Romania, which has a GDP *pro capite* significantly lower than the European average.

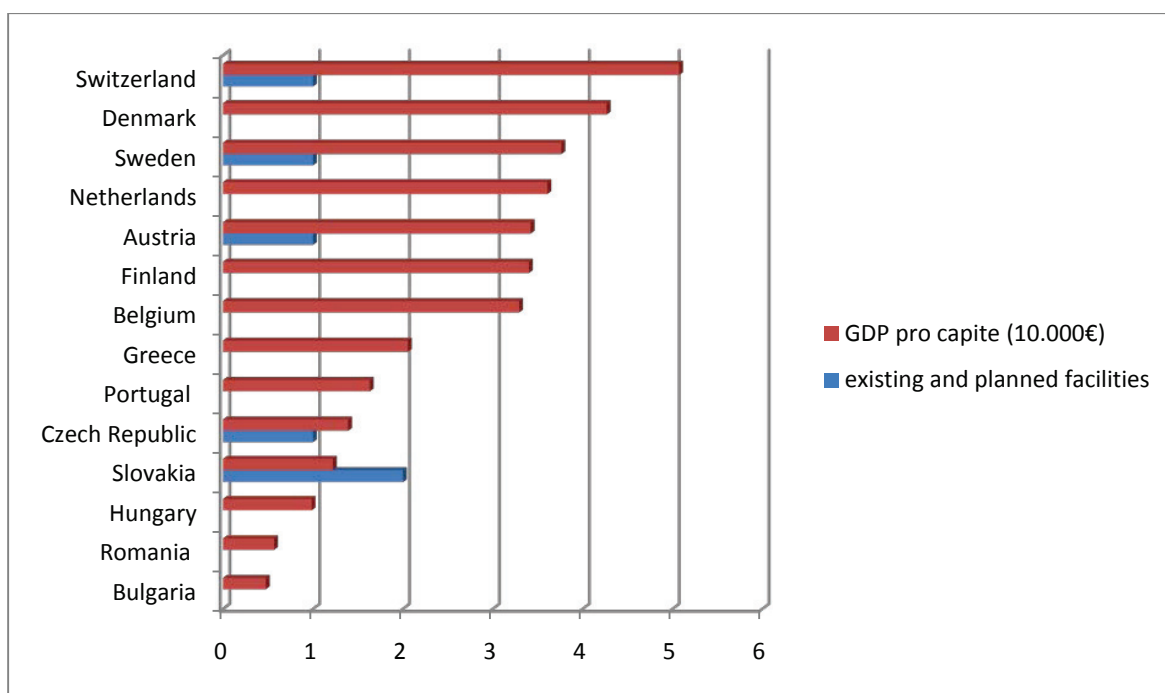


Table 2.3: Correlation between number of hadrontherapy facility and GDP *pro capite* in medium size countries



Figure 2.1: distribution of existing and planned hadrontherapy facilities in Europe

For the foreseeable future hadrontherapy is not supposed to become available at regional level; it will remain confined to a few specialized centers. Even though there is an interesting trend toward

hypofractionation (especially with ion beams) it is still necessary for the patient to move away from his home and spend several weeks at the treating facilities. It is interesting to investigate the geographic distribution of hadrontherapy facilities not only in terms of country boundaries but also in terms of actual site. As can be observed by the map in figure 2.1 there is a cluster of active facilities in central-western Europe and most new projects have grown around this initial cluster. The Italian facility in Sicily and the English facility that are outside this geographic distribution have low energy proton beams and therefore can be used only for the treatment of ocular cancers. The Swedish facility in Uppsala is also not state of the art and has technical limitations (there is indeed a project to upgrade it substantially). Considering the geographic distribution of hadrontherapy facilities it can be stated that peripheral European areas such as Scandinavia, the Balkans and the Iberian peninsula/south western France are underserved as compared to central Europe. In this frame the absence of projects in Spain is more significant than the absence of Belgian and Dutch projects as citizens from Netherlands and Belgium have easier access to neighboring centers in Germany and France. The situation in the British Islands is more uncertain and will be described in detail in the next chapter.

3 EXISTING AND PLANNED FACILITIES

In the present chapter characteristics of the European hadrontherapy facilities are investigated in detail. Facilities that are already treating patients up to October 2011 are here listed as “active” whereas those that have not yet started treating patients are listed as “planned”. Each facility has however to be described in its specificity. As it will result clearly some of the planned facilities are finishing commissioning and will be ready to treat patients in a few months and some other are only projects in an early phase; on the other hand some of the active centres are modern fully operational and capable of treating a large number of patients and some others are instead near the end of their lifecycle.

3.1 ACTIVE FACILITIES

Ion hadrontherapy

HIT Heidelberg (D)

Proton hadrontherapy (deep seated tumors)

CNAO Pavia (I)

CPO Orsay (F)

PSI Villingen (CH)

RPTC Munchen (D)

TSL UPPSALA (S)

Proton hadrontherapy (eye tumors)

CATANA Catania (I)

Center for Oncology Clatterbridge (UK)

HZB Berlin (D)

MEDICYC - NICE (F)

3.2 PLANNED FACILITIES

Ion hadrontherapy

PTZ MARBURG (D)

NRock KIEL (D)

MEDAUSTRON Wiener Neustadt (A)

ETOILE – LYON (F)

ARCHADE/ASCLEPIOS – CAEN (F)

Proton hadrontherapy (deep seated tumors)

- CPT TRENTO (I)
- CAL NICE (F)
- KOELN (D)
- WPE ESSEN (D)
- KRAKOW
- The Prague Medical Synchrotron Project* PRAGUE
- BIONT BRATISLAVA (SK)
- CMH RUZOMBEROK (SK)
- BRITISH PROJECT (ONE OR MORE?)

As one of the main mission of the ULICE project is to create a sort of network between the facilities and people working in the running ones and those working on the future ones, and to exploit the previous experiences to improve the efficiency of the new ones, we tried to understand which parameters can be used in order to evaluate which is the best way to face issues related to hadrontherapy.

Many parameters have been studied as descriptive of existing and planned hadron facilities. A list of relevant parameters have been created and agreed upon by the work-package members. Parameters are grouped in three areas.

1. **‘Facility data’** consists of a lean list of basic characteristics like delivery system, accelerating machine, number of treatment rooms and so on.
2. **‘Indications and epidemiology’** consists of a list of cancer treated in the facility or for which there are advanced projects to start clinical trials.
3. **‘Reimbursement fees’** consists of a general description of the reimbursement policies used by each facility.

FACILITY DATA FORM	
Name of the facility	
Country	
Ownership (public , private, university hospital, PPP)	
Present status (planned, financed, in construction, under commissioning, treating)	
Ground breaking date (real or planned)	
First patient date (real or planned)	
Foreseen number of patients per year	
Particle species	
Number of treatment rooms	
Beam delivery (active vs. passive or both), gantry , fixed lines, dedicated lines	
Accelerating machine (prototype or commercial product)	
Cost of the building	
Cost of the high technology	
Total cost	

Facility data collection Form

Indications					
	Already existing trial/protocol	High priority	Low priority	Only selected / compassionate cases	No indication
Salivary gland cancers					
Skull base Chordoma / Chondrosarcoma					
Malignant mucosal melanoma					
Non SCC head and neck cancer					
Paranasal sinuses SCC					
Head and neck SCC					
Head and neck sarcoma					
Eye melanoma					
Lacrimal gland/orbital cancer					
Esthesioneuroblastoma					
Meningioma					
High grade glial tumors					
Low-intermediate grade glial tumors					
Optic pathways glioma					
Thyroid cancer					
Esophageal cancer					
Timoma/mediastinal tumors					
Lung cancer					
Bone and soft tissue sarcoma (trunk, retroperitoneum, pelvis, shoulder)					
Bone and soft tissue sarcoma (limbs)					
Spinal sarcoma/sacral Chordoma					
Gastric cancer					
Pancreatic cancer					
HCC					
Biliary tract cancer					
Renal cancer					
Bladder cancer					
Prostate cancer					
Rectal cancer (recurrent)					
Rectal cancer (preoperative)					
Gynecological cancers					
Breast cancer					
Others					

Indications - Form 1

Indications					
	Already existing trial/protocol	High priority	Low priority	Only selected / compassionate cases	No indication
Pediatric solid tumors					
Medulloblastoma (CSI)					
Neuroblastoma					
Glial tumors					
Retinoblastoma					
Ewing sarcoma					
Rabdomyosarcoma					
Other sarcomas					
Wilms tumor					
Others					
Metastasis					
Single hepatic metastasis from Colon cancer					
Retinal/orbital metastasis					
Spinal metastasis					
Para-aortic lymphnodes metastasis					
Others					
Benign /functional treatments					
Acoustic neurinoma					
Pituitary adenoma					
Recurrent parotid adenoma					
Macular degeneration					
Epilectic foci					
Others					
Reirradiation after photon treatment					
Recurrent rectal cancer					
ACC salivary gland					
Recurrent NPX carcinoma					
Others					

Indications - Form 2

Epidemiology								
	Country population Quality of data			Number of candidates				
	Country and tumor specific data available	Extrapolated data	Expert opinion	prevalence / 100000	incidence / 100000	percentage treatable with Hadrontherapy	existing potential candidate	new patients per year
Salivary gland cancers							0	0
Skull base Chordoma / Chondrosarcoma							0	0
Malignant mucosal melanoma							0	0
Non SCC head and neck cancer							0	0
Paranasal sinuses SCC							0	0
Head and neck SCC							0	0
Head and neck sarcoma							0	0
Eye melanoma							0	0
Lacrimal gland/orbital cancer							0	0
Esthesioneuroblastoma							0	0
Meningioma							0	0
High grade glial tumors							0	0
Low-intermediate grade glial tumors							0	0
Optic pathways glioma							0	0
Thyroid cancer							0	0
Esophageal cancer							0	0
Timoma/mediastinal tumors							0	0
Lung cancer							0	0
Bone and soft tissue sarcoma (trunk, retroperitoneum, pelvis, shoulder)							0	0
Bone and soft tissue sarcoma (limbs)							0	0
Spinal sarcoma/sacral Chordoma							0	0
Gastric cancer							0	0
Pancreatic cancer							0	0
HCC							0	0
Biliary tract cancer							0	0
Renal cancer							0	0
Bladder cancer							0	0
Prostate cancer							0	0
Rectal cancer (recurrent)							0	0
Rectal cancer (preoperative)							0	0
Gynecological cancers							0	0
Breast cancer							0	0
Others							0	0

Epidemiology - Form 1

Epidemiology								
	Country population Quality of data			Number of candidates				
	Country and tumor specific data available	Extrapolated data	Expert opinion	prevalence / 100000	incidence / 100000	percentage treatable with Hadrontherapy	existing potential candidate	new patients per year
Pediatric solid tumors								
Medulloblastoma (CSI)							0	0
Neuroblastoma							0	0
Glial tumors							0	0
Retinoblastoma							0	0
Ewing sarcoma							0	0
Rabdomyosarcoma							0	0
Other sarcomas							0	0
Wilms tumor							0	0
Others							0	0
Metastasis								
Single hepatic metastasis from Colon cancer							0	0
Retinal/orbital metastasis							0	0
Spinal metastasis							0	0
Para-aortic lymphnodes metastasis							0	0
Others							0	0
Benign /functional treatments								
Acoustic neurinoma							0	0
Pituitary adenoma							0	0
Recurrent parotid adenoma							0	0
Macular degeneration							0	0
Epilectic foci							0	0
Others							0	0
Reirradiation after photon treatment								
Recurrent rectal cancer							0	0
ACC salivary gland							0	0
Recurrent NPX carcinoma							0	0
Others							0	0

Epidemiology - Form 2

		Billing method									
		comprehensive fee									
		detailed billing									
comprehensive fee											
		Carbon ions				Protons					
		full treatment	boost	stereotactic / special treatment	other	full treatment	boost	stereotactic / special treatment	other		
Private patients											
National health system patients											

Reimbursement fees - Form 1: Comprehensive Fee

detailed billing										
treatment preparation										
imaging			immobilization		planning		treatment hardware			
CT	MR	PET	immobilization procedure	personalized devices	image fusion	contouring	plan calculation / optimization	personalized bolus	personalized collimators	
Private patients										
National health system patients										

treatment				supportive care		
treatment session		or		visits	drugs	hospitalization
cost per session	cost per GyE	position verification				
Private patients						
National health system patients						

average number of fractions	average number of visits

Reimbursement fees - Form 2: Detailed billing

The samples tables have been sent to most of the cited centres but the number of feedbacks has been too low to be evaluated. Actually only one planned facility sent its answer, ETOILE.

4 CANCER EPIDEMIOLOGY IN EUROPE

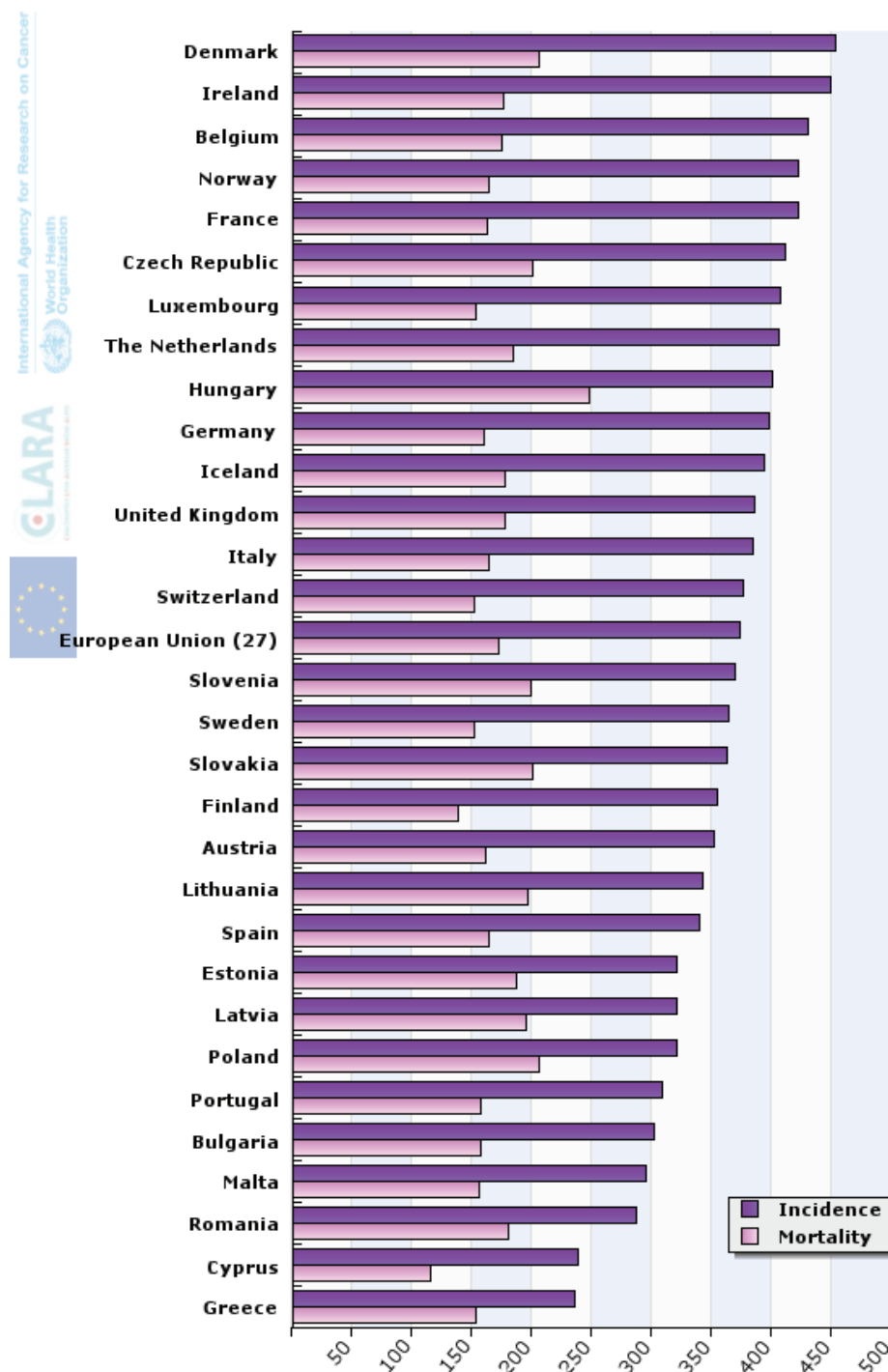


Table 4.1 Estimated incidence and mortality from all sites but non-melanoma skin cancer.

Comparing table 4.1 with table 2.3 it can possible to see a correlation between the incidence of tumours and the presence of planned/existing facilities in Europe.

5 PATIENTS ELIGIBLE TO HADRON THERAPY

Even assuming a complete knowledge of cancer epidemiology in Europe the estimate of potential candidates for hadrontherapy remains a very difficult and somewhat arbitrary one. Three different scenarios are here examined: a conservative one in which only diseases that have clear undisputed indication for hadrontherapy are considered, a practical one in which all diseases currently treated in active facility are included, and a limit one in which all diseases that may potentially benefit from hadrontherapy are deemed eligible.

5.1 Conservative scenario

It is a well known fact that hitherto hadrontherapy has never been tested in a controlled randomized clinical trial (RCT) against other kinds of advanced photons based radiotherapy. For protons hadrontherapy the biological effect does not differ significantly from that of photons. Advocates of protontherapy do not claim to achieve a better tumor control using the same prescription dose. They simply assume that the superior physical properties of proton must allow delivering the same dose to target volumes while better sparing organ at risk (and therefore reducing unwanted toxicity without reducing local control), or delivering a higher dose to the target without exceeding dose constraints on organ at risks (and therefore increasing local control without increasing unwanted toxicity). If protontherapy has to be tested in randomized trials they have to be focused on therapeutic index. There are anyway some cancers that have been historically successfully treated with protontherapy and for which it can be considered the standard therapeutic modality. Even in the most conservative scenario we consider patients affected by eye melanoma, chordoma of the skull base and spine and grade I-II chondrosarcoma of the skull base and spine as eligible for protontherapy. Besides these diseases we include also pediatric solid cancer currently treated with high dose photons radiotherapy due to the strong rationale. In fact the toxicity of RT on growing tissues is much more severe than in adults and therefore the ability of proton therapy to spare (almost completely) large volumes of non target tissues and avoid toxicity is sufficient to recommend their use in children. Tumors in which medium-low dose of radiotherapy are prescribed (Ewing sarcoma, neuroblastoma, lymphoma) will not be included but all tumors for which high dose of RT are currently used (CNS including medulloblastoma, sarcoma including rhabdomyosarcoma) are considered eligible for protontherapy.

Carbon ion radiotherapy is less well established than protontherapy, its indication are still more uncertain, the higher biological efficacy of carbon ion against the so called radioresistant tumors is potentially very interesting and clinical results from the Japanese and German facilities are extremely encouraging. Anyway it cannot yet be considered the standard treatment in any situation. Even in the most conservative scenario we can however consider as eligible for carbon ion radiotherapy those patients affected by diseases successfully treated in the past with this kind of treatment and that are not candidate to any other kind of curative therapy. Patients affected by non operable head and neck cancer of non squamocellular histology and patients with non operable trunk and pelvis sarcoma will therefore be included.

New cases are estimated from the IARC document 'Cancer incidence in five continents , volume IX'. In this document real incidence as measured by regional cancer registry is used to obtain a synthetic, age adjusted, incidence per 100.000 inhabitants. In our analysis we have considered a single national incidence, simply averaging those of the available regional registry weighting equally males and females. The data presented here is an estimate as it refers to past observation that cannot be applied automatically to the present especially as the age structure of each population is not constant. For some countries (Cyprus, Finland, Greece, Hungary and Luxembourg) no data are available. For these countries we have considered a medium European incidence obtained as the sum (weighted according to number of inhabitants) of the national incidences in countries for which there is actual data. For chondrosarcoma the only available data is the cumulative incidence for all body sites. The relative incidence of skull base and spine chondrosarcoma over the whole is unknown but it is considered a rare primary site. We have therefore considered an interval between 1% and 5% of all chondrosarcomas.

		PROTONS Estimated number of new cases per year					CARBON IONS Estimated number of new cases per year	
Country Name	Population (Millions) ¹	Eye melanoma	Skull base /spinal chordoma	Skull base /spinal chondrosarcoma	Population below 14 years of age(Millions) ₃	Pediatric solid cancer	Inoperable non SCC head and neck cancer	Inoperable trunk/pelvis sarcoma
Austria	8,3	32		0-1	1,24			
Belgium	10,7	32		0-2	1,81			
Bulgaria	7,6	15		0-1	1,03			
Cyprus*	0,8	3		0	0,14			
Czech	10,5	47		0-1	1,5			
Denmark	5,5	38		0	1			
Estonia	1,3	9		0	0,2			
Finland*	5,3	19		0-1	0,88			
France	64,3	286		1-7	11,9			
Germany	82	225		2-8	11			
Greece*	11,2	39		0-1	1,61			
Hungary*	10	35		0-1	1,47			
Ireland	4,5	29		0	0,96			
Italy	60	181		1-6	8,46			
Latvia	2,3	9		0	0,32			
Lithuania	3,3	13		0	0,5			
Luxembourg	0,5	2		0	0,09			
Malta	0,4	0		0	0,06			
Netherlands	16,4	71		1-3	2,9			
Poland	38,1	143		0-3	5,8			
Portugal	10,6	24		0-1	1,6			
Romania	21,5*	75		0-2	3,27			
Slovakia	5,4	30		0-1	0,82			
Slovenia	2	8		0	0,28			
Spain	45,8	96		1-5	6,82			
Sweden	9,2	41		0-1	3			
United	61,7	241		1-6	10,8			
Switzerland	7,8	25		0-1	1,19			
Total	507	1768		10-52				

Table 5.1: eligible new patients per year (conservative scenario)

6 Conclusions

The aim of this work package is to collect data useful for existing and planned facility and make them as available as possible. As the hadrontherapy facilities foresee very large investment, it is highly required an improvement on all the applied technologies involved in the treatments. The major concentration of facilities in certain economic and social European districts must not close the door to patients coming from other areas. On the contrary, to better exploit the investment, a larger flow of patients must be granted towards hadrontherapy centers are.

7 References

<http://epp.eurostat.ec.europa.eu/tgm/table.do?tab=table&language=en&pcode=tps00001&tableSelection=1&footnotes=yes&labeling=labels&plugin=1>

<http://epp.eurostat.ec.europa.eu/tgm/refreshTableAction.do?tab=table&plugin=1&pcode=tec00001&language=en>

<http://epp.eurostat.ec.europa.eu/tgm/refreshTableAction.do?tab=table&plugin=1&pcode=tps00010&language=en>

ECO, European Cancer Observatory. International Agency for Research on Cancer <http://eu-cancer.iarc.fr>, accessed on day/month/year.

La Vecchia C, Bosetti C, Lucchini F, et al. Cancer mortality in Europe, 2000-2004, and an overview of trends since 1975. *Ann Oncol.* 2010 Jun;21(6):1323-60.

Cancer Incidence in Five Continents, Volume IX / edited by M.P. Curado... [et al.] (IARC Scientific Publications; 160)

European Commission (1998a) Demographic Report 1997, D.G.V. Employment & Social Affairs. Social Protection and Social Action. Luxembourg.

Eurostat (1997) Demographic Statistics 1997. Luxembourg.

Warnes A. (1998) "Background report on Demographic Ageing and Late-Age Mortality Trends in Europe" Report for SCOPE, BioMed II. Project. University of Sheffield, U.K.

WHO Health for all Data Base. On line. January 1998. WHO Europe. Copenhagen



Project co-funded by the European Commission within the FP7 (2007–2013)

Grant agreement no.: 228436

ULICE

Union of Light Centres in Europe

Project type: Combination of CP & CSA
Integrating Activities / e-Infrastructures / Preparatory phase

Start date of project: 1st September 2009 Duration: 48 months

D.[NA 10.3] - Written protocols standardizing features of the active facility

WP n° and title:	WP 10 - Development and spreading of Europe wide common protocols standardizing operational procedures to facilitate access to hadron-therapy facility and intercomparison of results
WP leader:	Piero Fossati
Author(s):	Jacques Balosso, Marie-Helene Baron, Mario Ciocca, Rita Engenhardt-Cabillic, Alberto Iannalfi, Urszula Jelen, Piero Fossati, Andrea Mairani, Alfredo Mirandola, Jun-etsu Mizoe, Silvia Molinelli, Jean Michel Moreau, Pascal Pommier, Gloria Vilches Freixas, Barbara Vischioni, Viviana Vitolo, Guillaume Vogin, Andrea Wittig
Contributor(s):	Daniela Bettega, Roberto Cherubini, Yusuke Demizu, Yoshiya Furusawa, Gianfranco Grossi, Azusa Hasegawa, Tadashi Kamada, Masao Murakami, Takashi Nakano, Rosanna Nano, Tatsuya Ohno,

	Maria Antonella Tabocchini, Caterina Tanzarella , Hiroshi Tsuji, Hirohiko Tsujii
Pillar coordinator:	Manjit Dosanjh
Reporting period:	1

Dissemination Level		
PU	Public	x
PP	Restricted to other programme participants (including the Commission Services)	
RE	Restricted to a group specified by the consortium (including the Commission Services)	
CO	Confidential, only for members of the consortium (including the Commission Services)	

TABLE OF CONTENTS

LIST OF ABBREVIATIONS AND DEFINITIONS	4
1 GENERAL INTRODUCTION	6
2 QUALITY ASSURANCE PROTOCOL AT CENTRO NAZIONALE DI ADROTERAPIA ONCOLOGICA (CNAO), ITALY	7
3 THERAPEUTIC BEAMS BIOLOGICAL CHARACTERIZATION AT CENTRO NAZIONALE DI ADROTERAPIA ONCOLOGICA (CNAO), ITALY	33
4 IMMOBILIZATION PROCEDURES AT MARBURG PARTICLE THERAPY CENTER, MARBURG, GERMANY	37
5 IMMOBILIZATION PROCEDURES AT NATIONAL INSTITUTE OF RADIOLOGICAL SCIENCES (NIRS), CHIBA, JAPAN	44
6 IMMOBILIZATION PROCEDURES AT HYOGO ION BEAM MEDICAL CENTER (HIBMC), HYOGO, JAPAN	55
7 IMMOBILIZATION PROCEDURES AT GUNMA UNIVERSITY HEAVY ION MEDICAL CENTER (GHMC), MAEBASHI, JAPAN	64
8 PHYSICAL AND DOSIMETRIC BEAM CHARACTERISATION PROTOCOL AT CENTRO NAZIONALE DI ADROTERAPIA ONCOLOGICA (CNAO)	73
9 IMAGING AND CONTOURING PROCEDURES FOR HEAD AND NECK ADENOID CYSTIC CARCINOMA AT NATIONAL INSTITUTE OF RADIOLOGICAL SCIENCES (NIRS)	98
10 CONCLUSIONS	107

LIST OF ABBREVIATIONS AND DEFINITIONS

ACC: ADENOID CYSTIC CARCINOMA

CCD: CHARGE COUPLED DEVICE

CF: CALIBRATION FACTOR

CNAO: CENTRO NAZIONALE DI ADROTERAPIA ONCOLOGICA

CNS:

CT: COMPUTERIZED TOMOGRAPHY

CT-PET: COMPUTERIZED TOMOGRAPHY- POSITRON EMISSION TOMOGRAPHY

CTV: CLINICAL TARGET VOLUME

DDD: DEPTH DOSE DISTRIBUTION

DICOM: DIGITAL IMAGING AND COMMUNICATIONS IN MEDICINE

DKFZ : DEUTSCHE KREBSFORSCHUNGSZENTRUM

DOF: DEGREE OF FREEDOM

DRR: DIGITALLY RECONSTRUCTED RADIOGRAPHY

DVH: DOSE VOLUME HISTOGRAM

DWI: DIFFUSION WEIGHTED IMAGES

EBT: EXTERNAL BEAM THERAPY

EPR: ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE

EX: EXPOSURE

FOV: FIELD OF VIEW

FWHM: FULL WIDTH HALF MAXIMUM

GHMC: GUNMA UNIVERSITY HEAVY ION MEDICAL CENTER

GSI: GESELLSCHAFT FUR SCHWERIONENFORSCHUNG

GTV: GROSS TUMOR VOLUME

HIBMC: HYOGO ION BEAM MEDICAL CENTER

HIMAC: HEAVY IONS MEDICAL ACCELERATOR IN CHIBA

HIT: HEIDELBERGER IONENSTRAHL-THERAPIEZENTRUM

HSG: HUMAN SALIVARY GLANDS

HU: HOUNSFIELD UNITS

IAEA: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY

IBA: ION BEAM APPLICATIONS

ID: IMMOBILIZATION DEVICE

IEC: INTERNATIONAL ELECTROTECHNICAL COMMISSION

INFN: ISTITUTO NAZIONALE DI FISICA NUCLEARE

INMRI-ENEA: ISTITUTO NAZIONALE DI METROLOGIA DELLE RADIAZIONI IONIZZANTI- AGENZIA NAZIONALE PER LE NUOVE TECNOLOGIE, L'ENERGIA E LO SVILUPPO ECONOMICO SOSTENIBILE

ISS: ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'

JPY: JAPANESE YEN

LED: LIGHT EMITTING DIODE

LEM: LOCAL EFFECT MODEL

LNS: LABORATORI NAZIONALI DEL SUD

MR: MAGNETIC RESONANCE

MU: MONITOR UNITS

NIRS: NATIONAL INSTITUTE OF RADIOLOGICAL SCIENCES

NOD: NET OPTICAL DENSITY

OAR: ORGAN AT RISK

O/C: OPEN/CLOSE

PACS: PICTURE ARCHIVING AND COMMUNICATION SYSTEM

PET: POSITRON EMISSION TOMOGRAPHY

PMMA: POLYMETHYLMETHACRYLATE

PSI: PAUL SCHERRER INSTITUTE

PTV: PLANNING TARGET VOLUME

RBE: RELATIVE BIOLOGICAL EFFECTIVENESS

RT: RADIOTHERAPY

SE: SPIN ECHO

SOBP: SPREAD OUT BRAGG PEAK

SSDL: SECONDARY STANDARDS DOSIMETRY LABORATORIES

TE: ECHO TIME

TERA: TERAPIA ADRONICA

TPS: TREATMENT PLANNING SOFTWARE

TR: REPETITION TIME

TRS: TECHNICAL REPORT SERIES

TSE: TIME SPIN ECHO

WEPL: WATER EQUIVALENT PATH LENGHT

1 GENERAL INTRODUCTION

Hadrontherapy is an extremely advanced kind of radiotherapy. Acceleration of particle beams and delivery of these accelerated beams to the patient can be considered the core of hadrontherapy.

Several collateral procedures are needed to take full advantage of the physical and radiobiological characteristics of particle beams, and to transform them into a real benefit for the patient. Sometimes these procedures are qualitatively similar to those of photons radiotherapy and differ only quantitatively in the degree of necessary precision (patient positioning and position verification), sometimes they are entirely specific to particle (beam commissioning).

Substantial experience in carbon ion hadrontherapy exists in Japan and in Europe where many active facilities have developed their own procedures and have tested them in practice. This operative know how has immense value but is often not fully described in well defined protocols. The first task of ULICE WP 10 has been to analyze relevant procedures, as they are performed in active facilities, and describe them in protocols. This job has been possible with the help of Institutions that are not members of the ULICE project and that have contributed with their cooperation, time, advice and support. ULICE members have written the protocols presented in the following sections. All protocols describing procedures carried out in the Japanese facilities (external to ULICE project) of NIRS in Chiba, HIBMC in Hyogo and GHMC in Maebashi have been checked, approved and authorized by key members of the said facilities. In particular the contribution of NIRS personnel in the creation of the protocol on adenoid cystic carcinoma contouring has been of a real co-authorship (as specified in section 9). Researchers participating in this work package want to express their gratitude for the help of the Japanese colleagues and especially of Prof. Tsujii, Dr. Kamada, Dr. Tsuji and Dr. Hasegawa of NIRS, Prof. Nakano and Dr. Ohno of GHMC and Prof. Murakami, and Dr. Demizu of HIBMC.

These first protocols are a significant contribution toward the objective of this WP that is the "Spreading of good practices helping to promote and stimulate the exchange of experience between the existing centres and newly emerging facilities". These first protocols will be instrumental in order to produce the final synthetic protocols with the agreed upon ULICE recommendation.

4 IMMOBILIZATION PROCEDURES AT MARBURG PARTICLE THERAPY CENTER, MARBURG, GERMANY

Authors: Andrea Wittig¹, Urszula Jelen¹, Rita Engenhardt-Cabillic¹, Jean Michel Moreau², Guillaume Vogin², Jacques Balosso³, Pascal Pommier³, Marie-Helene Baron³

¹ Philipps-University Marburg, Germany; ² UCBL: Université Claude Bernard Lyon, France; ³ ETOILE: Espace de Traitement Oncologique par Ions Legers Europeen – European Light Ion Oncological Treatment Centre, France

Name of the institution: **Partikel Therapy Zentrum Marburg**

Country: **GERMANY**

4.1 the survey

Immobilization devices (ID) ensure a reproducible irradiation during the treatment course. They aim to reduce the treatment setup errors and intra/inter fractional tumor motion (CTV to PTV margins) WITHOUT interfering significantly with the beam's characteristics.

The following survey aims to intercompare the practices in terms of immobilization between the existing or planned particle radiotherapy facilities within Europe. ID have to be mentioned in any clinical protocol in order to interpret the results. Uniformized practices may help to reduce methodological biases in the coming multicentric trials.

1. Technical issues

1.1 What kind of immobilization devices (ID) do (will/would) you use?

homemade

manufactured: which company/brand? **Macromedics, CIVCO**

1.2 Are (will/would they be) they?

standardized

customized

If you answered « customized »,

1.3 Who is in charge of the preparation of the ID?

the radiation oncologist

the physicist

a dedicated immobilization specialist

- a radiation therapist / technologist, (+ ID checked by radiation oncologist)
- a radiation dosimetrist

1.4 How long does it take to manufacture any ID for any adult patient?

15-40 minutes

1.5 When does it take place in the treatment process?

- prior to the planning CT
- at the same time as the planning CT

1.6 Do (will/would) you use any of these ID?

Bite block

yes no

Thermoplastic mesh mask (aquaplast™) and other holders

yes no (but solid rather than mesh mask)

Vacuum bags

yes no

Body fix™ (hip fix)

yes no

Plastic casting holders (eg. body thermoplastic mask)

yes no

Stereotactic head frame

yes no

Alpha cradle™ rising foam

yes no

Moldcare™

yes no

Any other common ID:

ULICE -GA n°228436

1.7 What kind of material would you recommend?

- carbon fiber
- acrylic
- polyurethane
- other:

No specific recommendation

2. Physical issues

2.1 Did (will/would) you modelize its attenuation in your TPS?

- yes
- no (only Hounsfield numbers)

2.2 Did (will/would) you pay attention to its chemical composition?

- yes
- no

2.3 Is (will/would) the incident ion beam going (go) through the ID mater?

- yes (but sharp edges in the field will be avoided)
- no

If you answered « yes »,

2.4 Do (will/would) you take it into account for the dosimetry?

- yes
- no

How?

-

Stopping power calculated based on CT HU values.

2.5 Due to the particular interactions taking place into the ID, shall (should) it give rise to any specific radioprotection issue (activation, neutron emission, dose increase to the skin, etc)?

- yes
- no

If « yes », precise:

3. Economical issues

3.1 Did (will/would) you pay attention to its cost?

yes

no

6.2 Where do (will/would) you store the ID?

dedicated storage space

6.3 Do (will/would) you reuse/recycle the ID?

yes (partly e.g. vacuum bags)

no

7. Synthesis

Rank the properties that must have the mater of which is made the ID

(1: mandatory ⇒ 9: not necessary)

3 low attenuation levels (+homogenous)

7 lightweight

2 durable

7 cheap

1 efficient (less movement permitted)

9 reusable

5 modifiable during the treatment course

6 not claustrophobia/anxiety inducers/open or transparent

4 comfortable

4.2 Procedure description

4.2.1 General considerations

Several issues, specific to the upcoming Particle Therapy Center of Marburg, had to be taken into consideration in the process of optimizing the patient immobilization concept.

The PTZ will be equipped with robotic tables in the irradiation rooms (caves) and CT rooms. For patient immobilization, designated preparation rooms are planned. In the eventual workflow, the patients will be moved between the preparation rooms, CT rooms and caves on a specially designed shuttle. The preparation rooms will be equipped with specially designed recliners with the help of which the couch top (together with a vacuum cushion)

will be put to nearly vertical position (patient getting in the vacuum cushion) and lowered to horizontal position to be placed on the shuttle.

The technical solutions regarding the patient couch at PTZ are provided by Siemens PT (Siemens, Erlangen, Germany), therefore the selected immobilization equipment had to be compatible with the robotic table provided by Siemens. Only flat table top solutions are possible (no pod, no stereotactic fixation system protruding beyond the edge of the table).

4.2.2 Immobilization concept outline for specific anatomical sites

a) Head

For irradiations of head tumors, 3-point thermoplastic masks of continuous (non-perforated) material (Aqplast or equivalent) with individual mouthpiece to improve the reproducibility of immobilization, currently under tests in the clinical routine at the Department of Radiotherapy in Marburg, are planned. The mask will be moulded with special consideration to form precisely the chin, nasal ridge and eye brows.

As additional equipment, a set of standardized or individual head supports will be used.

For some irradiations and, in the future, for some (benign) ailments (like arteriovenous malformations or trigeminal neuralgia) considered as indications for particle therapy due to its high conformity, a table-top stereotactic immobilization system will be selected (enabling both, invasive and non-invasive fixation).

b) Head-and-neck

For irradiations of head-and-neck tumors, 5-point thermoplastic masks of continuous (non-perforated) material (Aqplast or equivalent), currently under tests in the clinical routine at the Department of Radiotherapy in Marburg, will be used. The mask will be moulded with special consideration to form precisely the chin, nasal ridge and eye brows and to obtain reproducible placement of patients' shoulders.

As additional equipment, a set of standardized or individual head supports will be used.

c) Pelvic region

For treatments in the pelvic region the supine position with whole body vacuum cushion or pelvis mask is planned (tests on-going).

During the practical feasibility tests, performed at the Department of Radiotherapy in Marburg by a multidisciplinary team of RTTs, medical doctors and physicists, guidelines were defined on forming the vacuum cushions in order to avoid introducing moulded material in the way of possible irradiation ports. In the start-up phase (before the introduction of the reclining device and the shuttle), shorter vacuum cushions encompassing only the area between tights and waist, easier to use for the patients, are considered.

In prostate treatments the issue of internal target movement will be addressed by applying a bowel/bladder preparation protocol and dietary advice. The use of endorectal balloons (ERB), recommended by some particle therapy centers, both as an immobilization device and a way to reduce adverse dosimetric effects of the air present in the rectum, is currently being tested.

d) Upper abdomen and thorax

Based on the experience gathered with radiosurgical lung and liver treatments at the Department of Radiotherapy in Marburg, for treatments in the upper abdomen and thorax region the use of whole body vacuum cushions is planned, for some patients in combination with an abdominal compression device.

Additionally, clinical concepts are under development to apply Breath-Hold or Jet-Ventilation techniques to alleviate the problem of the breathing induced movement.

5 IMMOBILIZATION PROCEDURES AT NATIONAL INSTITUTE OF RADIOLOGICAL SCIENCES (NIRS), CHIBA, JAPAN

Authors: Piero Fossati¹, Silvia Molinelli¹, Barbara Vischioni¹, Jean Michel Moreau², Guillaume Vogin², Jacques Balosso³, Pascal Pommier³, Marie-Helene Baron³

¹CNAO: Centro Nazionale di Adroterapia Oncologica, Italy; ²UCBL: Université Claude Bernard Lyon, France; ³ETOILE: Espace de Traitement Oncologique par Ions Legers Europeen – European Light Ion Oncological Treatment Centre, France

Name of the institution: **NIRS**

Country: **JAPAN**

5.1 the survey

Immobilization devices (ID) ensure a reproducible irradiation during the treatment course. They aim to reduce the treatment setup errors and intra/inter fractional tumor motion (CTV to PTV margins) WITHOUT interfering significantly with the beam's characteristics.

The following survey aims to intercompare the practices in terms of immobilization between the existing or planned particle radiotherapy facilities within Europe. ID have to be mentioned in any clinical protocol in order to interpret the results. Uniformized practices may help to reduce methodological biases in the coming multicentric trials.

1. Technical issues

1.1. What kind of immobilization devices (ID) do (will/would) you use?

- homemade
- manufactured: which company/brand? **MOLDCARE**

1.2. Are (will/would they be) they?

- standardized
- customized

If you answered « customized »,

1.3. Who is in charge of the preparation of the ID?

- the radiation oncologist **1 unit**
- the physicist
- a dedicated immobilization specialist
- a radiation therapist / technologist ? **2 therapist + 1 nurse**
- a radiation dosimetrist

1.4. How long does it take to manufacture any ID for any adult patient?

30 minutes

1.5. When does it take place in the treatment process?

prior to the planning CT

at the same time as the planning CT

1.6. Do (will/would) you use any of these ID?

Bite block

yes no

Thermoplastic mesh mask (aquaplast™) and other holders

yes no

Vacuum bags

yes no

Body fix™ (hip fix)

yes no

Plastic casting holders

yes no

Stereotactic head frame

yes no

Alpha cradle™ rising foam

yes no

Moldcare™

yes no

Any other common ID:

Body mask, Face mask

1.7. What kind of material would you recommend?

carbon fiber

acrylic

polyurethane

other:

No specific recommendation

2. Physical issues

2.1. Did (will/would) you modelize its attenuation in your TPS?

yes

no (only Hounsfield numbers)

2.2. Did (will/would) you pay attention to its chemical composition?

yes

no

2.3. Is (will/would) the incident ion beam going (go) through the ID mater?

yes

no

If you answered « yes »,

2.4. Do (will/would) you take it into account for the dosimetry?

yes

no

How?

Stopping power of mask/pillow is calculated based upon its Hounsfield number. The beam should not enter through borders or holes in the mask

2.5. Due to the particular interactions taking place into the ID, shall (should) it give rise to any specific radioprotection issue (activation, neutron emission, dose increase to the skin, etc)?

yes

no

If « yes », precise:

Low activation for less than one hour, used masks can be disposed of without any particular care

3. Economical issues

3.1. Did (will/would) you pay attention to its cost?

yes

no

6.2. Where do (will/would) you store the ID?

In the treatment room

6.3. Do (will/would) you reuse/recycle the ID?

yes

no

7. Synthesis

Rank the properties that must have the mater of which is made the ID

(1: mandatory \Rightarrow 9: not necessary)

5 low attenuation levels

9 lightweight

1 durable

7 cheap

1 efficient (less movement permitted)

9 reusable

3 modifiable during the treatment course

7 not claustrophobia/anxiety inducers/open or transparent

4 comfortable

Other: Homogenous (mesh masks would affect particle range inhomogeneously and are not recommended)

5.2 Procedure description

Patients are positioned in a rotating cradle. Rotation around the longitudinal axis of $\pm 20^\circ$ is used to compensate the lack of gantry. Identical rotating cradles are placed on the simulation CT couch and in the treatment rooms.



Figure 5.1: Rotating cradle



Figure 5.2: Patient positioned in the treatment room, immobilized with mask and with rotated couch

Patient is immobilized with MOLDCARE™ pillows. Pillows are modeled on the patient body when wet, as they dry they retain the given shape. This kind of pillows is considered more reliable than the usually employed vacuum pillows. It is possible to conform the pillow to the anatomy of several districts and it lasts throughout the duration of therapy. Cost is usually higher than for the re-usable

vacuum pillows.



Figure 5.3: Moldcare™ pillows are available in different sizes (brand detail)



Figure 5.4: customized pillow

Outline of body contour on the pillow is usually drawn by pen. According to the site to be irradiated size and number of pillows may vary.

For feet immobilization a disposable Instapakquick™ vacuum pillow is employed



Figure 5.5: Instapakquick™ feet pillow



Figure 5.6: brand detail of feet pillow

The patient is immobilized with a thermoplastic mask. The usual mesh mask is not employed as the carbon ion range would be affected. A uniform mask is employed. The mask is wrapped around the patient-pillow-cradle block and is fixed with straps. Masks of solid continuous type are manufactured by a Japanese firm as customized item for NIRS. Mask thickness is 3 mm. A ULICE -GA n°228436

detailed study of attenuation properties of mask material is not considered necessary, the CT numbers of the mask are converted into stopping power for ions using the same conversion curve as for patients tissues.



Figure 5.7: Mask brand. Transliterated product name reads 'Shell fitter', transliterated brand name reads 'KURARE Trading company'

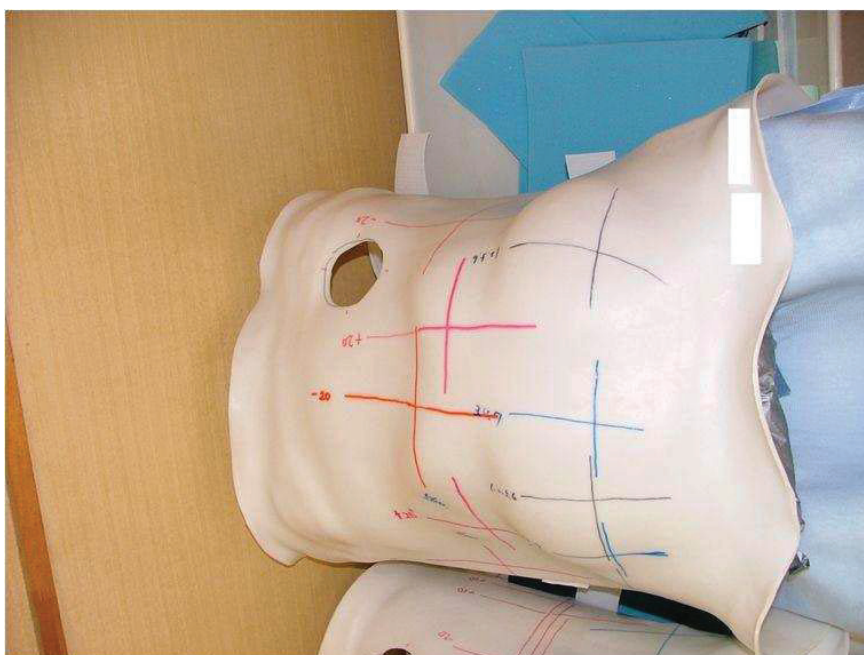


Figure 5.8: Body mask. Cross in various colors represent isocenters as shown by lasers. The hole is for positioning a LED on the patient body surface and monitor breathing cycle.

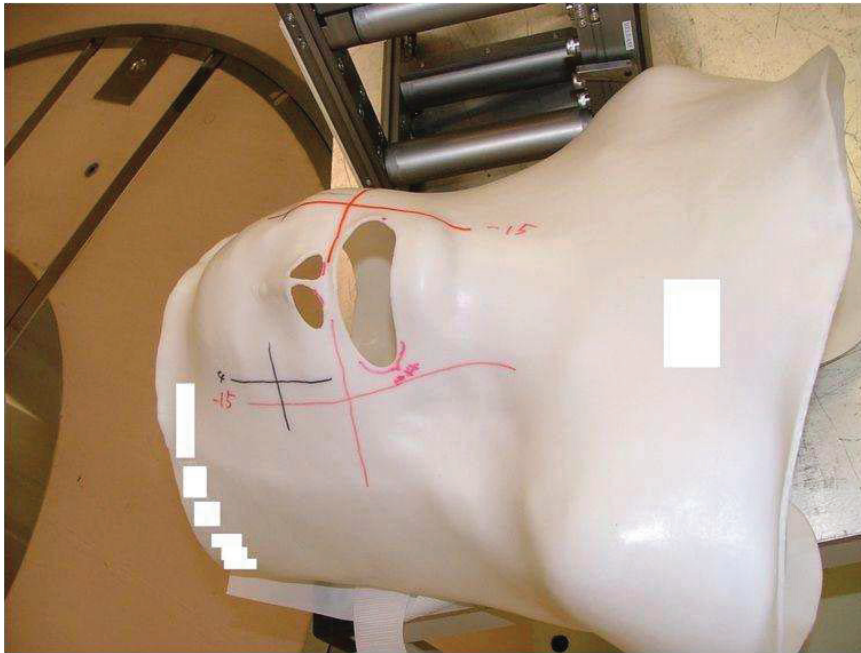


Figure 5.9: head mask. Usually no hole is made for the eyes



Figure 5.10: Mask is fixed with strap around the Cradle

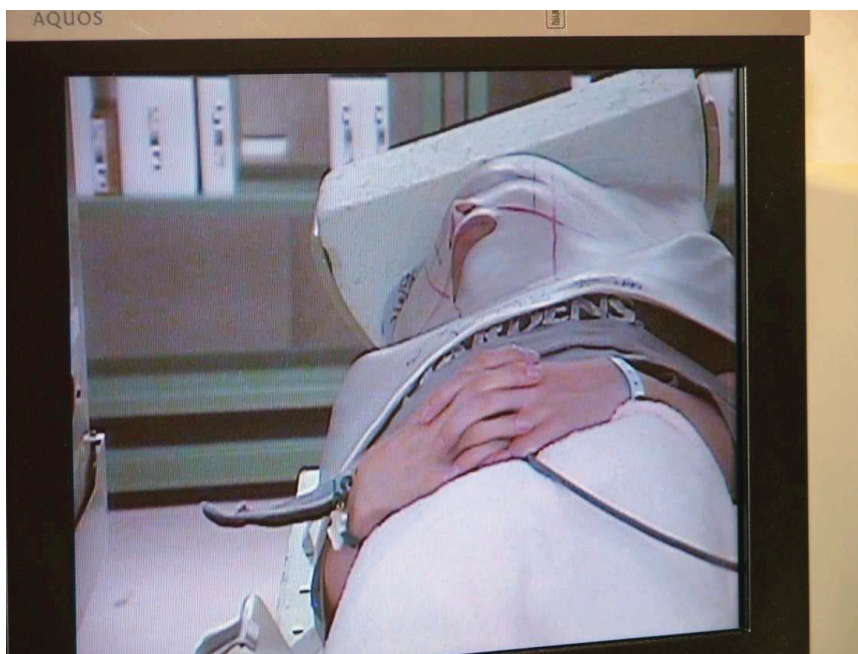


Figure 5.11: patient immobilized with cradle, pillow and mask has minimum residual motion even if the cradle is rolled. Straps may be used for arm fixation.

The immobilization device is prepared in a dedicated session, usually after first visit and before simulation CT. This session takes place in a dedicated room and is carried out by 1 medical doctor 2 technicians and 1 nurse. Diagnostic imaging of the patient is available to the physician during this session (through a PACS access with diagnostic quality screen). In this session the definitive positioning is decided. Considering the technical limitations of fixed beams, sometimes multiple immobilization devices are manufactured for a single patient (e.g. supine positioning and prone positioning).

6 IMMOBILIZATION PROCEDURES AT HYOGO ION BEAM MEDICAL CENTER (HIBMC), HYOGO, JAPAN

Authors: Piero Fossati¹, Silvia Molinelli¹, Barbara Vischioni¹, Jean Michel Moreau², Guillaume Vogin², Jacques Balosso³, Pascal Pommier³, Marie-Helene Baron³

¹CNAO: Centro Nazionale di Adroterapia Oncologica, Italy; ²UCBL: Université Claude Bernard Lyon, France; ³ETOILE: Espace de Traitement Oncologique par Ions Legers Europeen – European Light Ion Oncological Treatment Centre, France

Name of the institution: **Hyogo Ion Beam Medical Center**

Country: **JAPAN**

6.1 the survey

Immobilization devices (ID) ensure a reproducible irradiation during the treatment course. They aim to reduce the treatment setup errors and intra/inter fractional tumor motion (CTV to PTV margins) WITHOUT interfering significantly with the beam's characteristics.

The following survey aims to intercompare the practices in terms of immobilization between the existing or planned particle radiotherapy facilities within Europe. ID have to be mentioned in any clinical protocol in order to interpret the results. Uniformized practices may help to reduce methodological biases in the coming multicentric trials.

8. Technical issues

8.1. What kind of immobilization devices (ID) do (will/would) you use?

- homemade
- x manufactured: which company/brand? **MOLDCARE, ESFORM**

8.2. Are (will/would they be) they?

- standardized
- x customized

If you answered « customized »,

8.3. Who is in charge of the preparation of the ID?

- the radiation oncologist
- the physicist
- a dedicated immobilization specialist
- x a radiation therapist / technologist ?
- a radiation dosimetrist

8.4. How long does it take to manufacture any ID for any adult patient?

11.1. Did (will/would) you pay attention to its accuracy?

- yes
- no

11.2. How do (will/would) you check the accuracy of your ID / repositioning?

- daily imaging (X-ray or portal or Cone-Beam)
- weekly imaging (X-ray or portal or Cone-Beam)
- In-situ CT scan X
- In-situ PET imaging

11.3. Do (will/would) you use a robotic treatment table?

- yes 5 DOF + 1 DOF adjustable by hand
- no

12. Pediatric specificities

12.1. Do (will/would) you use specific ID for children

- yes
- no

No pediatric treatment

12.2. If yes, which one(s) ?

⋮

12.3. Would you recommend beams traversing the anesthesia mask in H&N, CNS or skull base locations?

- yes
- no

13. Miscellaneous

13.1. Do (will/would) you train the radiation therapist to the proper use of the ID ?

- yes
- no

13.2. Where do (will/would) you store the ID?

In treatment room

13.3. Do (will/would) you reuse/recycle the ID?

- yes



Figure 6.2: Customized pillow (MOLDCARE)



Figure 6.3: pillow brand detail

Patient is immobilized with MOLDCARE™ pillows. Pillows are modeled on the patient body when wet, as they dry they retain the given shape. This kind of pillows is considered more reliable than the usually employed vacuum pillows. It is possible to conform the pillow to the anatomy of several

districts and it lasts throughout the duration of therapy. Cost is usually higher than for the re-usable vacuum pillows.

The patient is immobilized with a thermoplastic mask. The usual mesh mask is not employed as the carbon/proton ion range would be affected. A uniform mask is employed. ESFORM™ masks are employed but a non perforated type is used. For head and neck a bite-block is manufactured with the same material and is fixed to the mask.

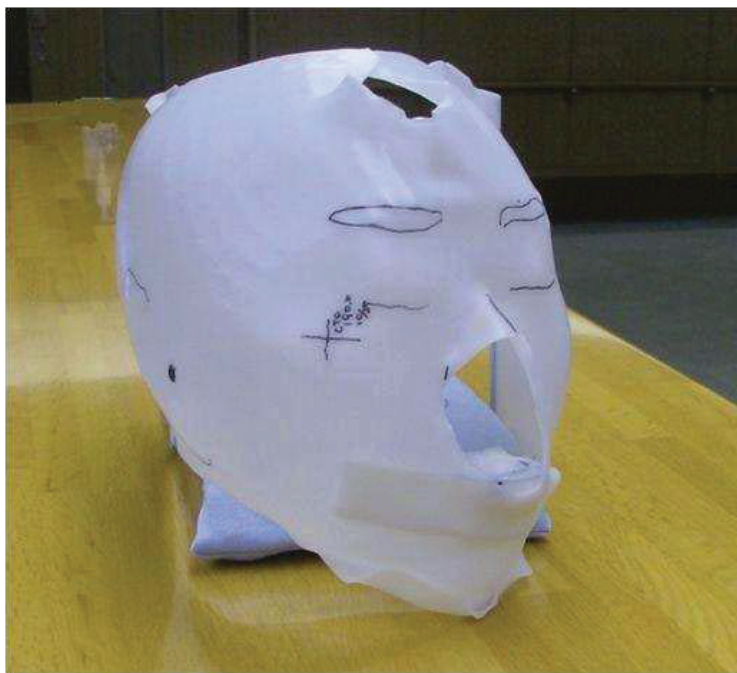


Figure 6.4: Face mask

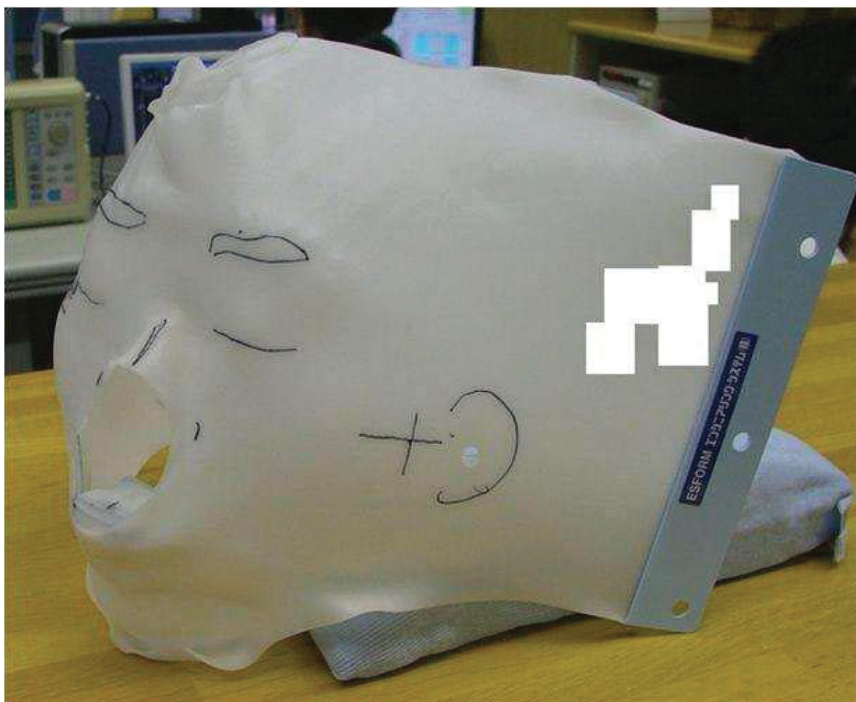


Figure 6.5: Mask brand detail

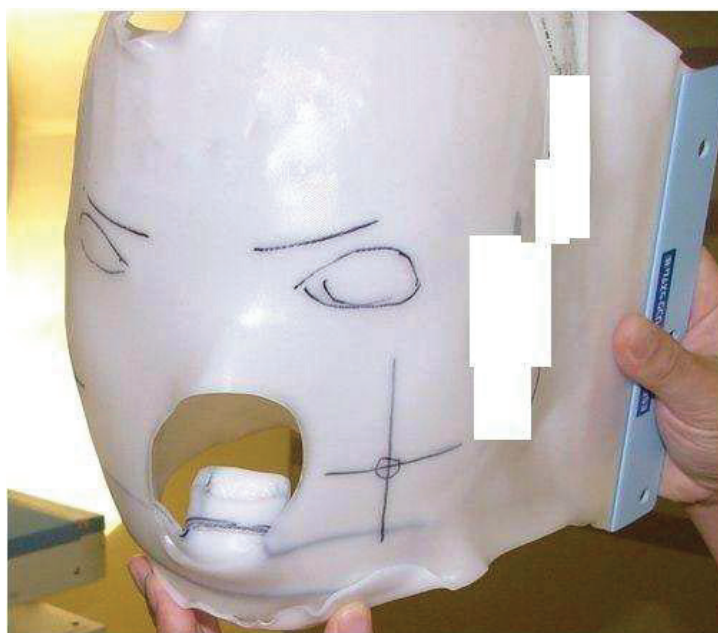


Figure 6.6: bite block (from the outside)

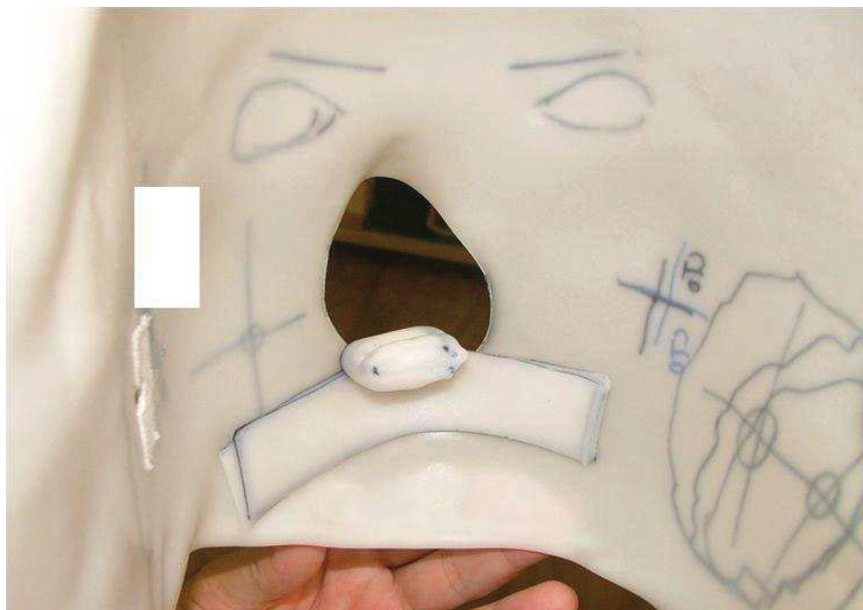


Figure 6.7: bite block (from the inside)



Figure 6.8: Body mask during preparation

The immobilization device is prepared in a dedicated session, usually after first visit and before simulation CT.

7 IMMOBILIZATION PROCEDURES AT GUNMA UNIVERSITY HEAVY ION MEDICAL CENTER (GHMC), MAEBASHI, JAPAN

Authors: Piero Fossati¹, Silvia Molinelli¹, Barbara Vischioni¹, Jean Michel Moreau², Guillaume Vogin², Jacques Balosso³, Pascal Pommier³, Marie-Helene Baron³

¹CNAO: Centro Nazionale di Adroterapia Oncologica, Italy; ²UCBL: Université Claude Bernard Lyon, France; ³ETOILE: Espace de Traitement Oncologique par Ions Legers Europeen – European Light Ion Oncological Treatment Centre, France

Name of the institution: **Gunma Heavy Ion Medical Center**

Country: **JAPAN**

7.1 the survey

Immobilization devices (ID) ensure a reproducible irradiation during the treatment course. They aim to reduce the treatment setup errors and intra/inter fractional tumor motion (CTV to PTV margins) WITHOUT interfering significantly with the beam's characteristics.

The following survey aims to intercompare the practices in terms of immobilization between the existing or planned particle radiotherapy facilities within Europe. ID have to be mentioned in any clinical protocol in order to interpret the results. Uniformized practices may help to reduce methodological biases in the coming multicentric trials.

15. Technical issues

15.1. What kind of immobilization devices (ID) do (will/would) you use?

x homemade

x manufactured: which company/brand? **MOLDCARE, CIVCO, ESFORM**

15.2. Are (will/would they be) they?

standardized

x customized

If you answered « customized »,

15.3. Who is in charge of the preparation of the ID?

x the radiation oncologist (**not mandatory**)

the physicist

- a dedicated immobilization specialist
- a radiation therapist / technologist ? **2 therapist + 1 nurse**
- a radiation dosimetrist

15.4. How long does it take to manufacture any ID for any adult patient?

30 minutes

15.5. When does it take place in the treatment process?

- prior to the planning CT
- at the same time as the planning CT

15.6. Do (will/would) you use any of these ID?

Bite block

yes no

Thermoplastic mesh mask (aquaplast™) and other holders

yes no

Vacuum bags

yes no

Body fix™ (hip fix)

yes no

Plastic casting holders

yes no

Stereotactic head frame

yes no

Alpha cradle™ rising foam

yes no

Moldcare™

yes no

Any other common ID:

⋮
⋮

18.3. Would you recommend beams traversing the anesthesia mask in H&N, CNS or skull base locations?

- yes
- no

19. Miscellaneous

19.1. Do (will/would) you train the radiation therapist to the proper use of the ID ?

- yes
- no

19.2. Where do (will/would) you store the ID?

Treatment room, immobilization room, dedicated store

19.3. Do (will/would) you reuse/recycle the ID?

- yes
- no

20. Synthesis

Rank the properties that must have the mater of which is made the ID

(1: mandatory ⇒ 9: not necessary)

- low attenuation levels
- lightweight
- durable
- cheap
- efficient (less movement permitted)
- reusable
- modifiable during the treatment course
- not claustrophobia/anxiety inducers/open or transparent
- comfortable

Other:

7.2 Procedure description

Patients are positioned in a rotating cradle. Rotation around the longitudinal axis of $\pm 20^\circ$ is used to compensate the lack of gantry. Identical rotating cradles are placed on the simulation CT couch and in the treatment rooms.



Figure 7.1: Rotating cradle

Patient is immobilized with MOLDCARE™ pillows. Pillows are modeled on the patient body when wet, as they dry they retain the given shape. This kind of pillows is considered more reliable than the usually employed vacuum pillows. It is possible to conform the pillow to the anatomy of several districts and it lasts throughout the duration of therapy. Cost is usually higher than for the re-usable vacuum pillows.



Figure 7.2: Moldcare™ pillows (brand detail)



Figure 7.3: customized pillow

Sometimes re-usable ESFORM or CIVCO vacuum pillows are employed (e.g. as leg support in head and neck treatments)



Figure 7.4: vacuum pillow

The patient is immobilized with a thermoplastic mask. The usual mesh mask is not employed as the carbon ion range would be affected. A uniform mask is employed. The mask is wrapped around the patient-pillow-cradle block and is fixed with straps. Masks of solid continuous type are manufactured by a Japanese firm as customized item for NIRS. Mask thickness is 3 mm. A detailed study of attenuation properties of mask material is not considered necessary, the CT numbers of the mask are converted into stopping power for ions using the same conversion curve as for patients tissues.



Figure 7.5: Head mask, solid type



Figure 7.6: Body mask, solid type

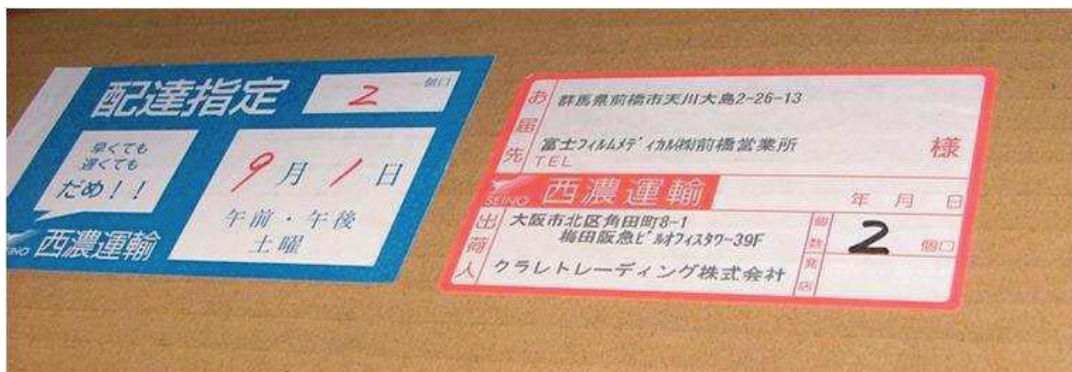


Figure 7.7: Mask brand. Transliterated brand name reads 'KURARE Trading company'

The immobilization device is prepared in a dedicated session, usually after first visit and before simulation CT. This session takes place in a dedicated room and is carried out by 2 technicians and 1 nurse. A medical doctor is usually but not always present (depending on the complexity of the procedure).

10 CONCLUSIONS

First protocols have been created. Based on the pre-existing links a most fruitful scientific cooperation has been established with Japanese carbon ion hadrontherapy facilities focused on the activities of the ULICE project.



Project co-funded by the European Commission within the FP7 (2007–2013)

Grant agreement no.: 228436

ULICE

Union of Light Centres in Europe

Project type: Combination of CP & CSA
Integrating Activities / e-Infrastructures / Preparatory phase

Start date of project: 1st September 2009 Duration: 48 months

D.[NA 10.5] - ULICE website with standardized protocols [month 42]
Delivery date: (month 42) 14/08/31

WP10 – Development and spreading of Europe wide common protocols standardizing operational procedures to facilitate access to hadrontherapy facilities and intercomparison of results

WP leader: Piero Fossati

	Name	Partner	
Author(s):	U. Jelen G.Vogin F.Ammazzalorso	UNIMAR UCBL UNIMAR	2014/08/31
Contributor(s):	A. Santiago, P. Fossati, U. Mock, P. Georg, JE Mizoe, H. Tsujii	CNAO, MEDA, MUW, GHMC, HIBMC, NIRS	
Pillar coordinator:	M. Dosanjh	CERN	
Approved by TPB and CPO		signature	

Dissemination Level		
PU	Public	×
PP	Restricted to other programme participants (including the Commission Services)	
RE	Restricted to a group specified by the consortium (including the Commission Services)	
CO	Confidential, only for members of the consortium (including the Commission Services)	

TABLE OF CONTENTS

1. LIST OF ABBREVIATIONS.....	3
2. INTRODUCTION.....	4
3. PURPOSE OF THIS DOCUMENT.....	5
4. PROTOCOL DESIGN PRINCIPLES.....	6
5. IMMOBILIZATION PROTOCOLS.....	7
5.1. General considerations.....	7
5.1.1. Patient support.....	7
5.1.2. Ensuring immobilization through the radiotherapy process.....	8
5.1.3. Hadron therapy specific considerations.....	8
5.1.4. Desirable characteristics of immobilization device(s).....	12
5.1.5. Staff - responsibilities and training.....	12
5.1.6. Other aspects of positioning reproducibility.....	13
5.1.7. Standardization issues.....	13
5.2. Indication-specific immobilization protocols	14
5.2.1. Intracranial treatments.....	14
5.2.2. Head-and-neck treatments.....	16
5.2.3. Thorax, mediastinum and upper abdomen treatments.....	18
5.2.4. Lower abdomen/pelvic treatments.....	21
5.2.5. Paraspinal treatments.....	23
5.3. Standardized protocol.....	25
6. IMPLEMENTATION GUIDELINES.....	26
6.1. Local protocol design.....	26
6.2. Implementation.....	28
6.3. Training.....	28
6.4. Audit.....	28
7. REFERENCES.....	29
Appendix A.....	31

1. LIST OF ABBREVIATIONS

2D/3D	– two-dimensional (planar) / three-dimensional (volumetric)
ASTRO	– American Society for Radiation Oncology
CNAO	– Centro Nazionale di Adroterapia Oncologica
CT	– computed tomography
EORTC	– European Organisation for Research and Treatment of Cancer
ETOILE	– European Light Ion Oncological Treatment Centre
ERB	– endo-rectal balloon
GHMC	– Gunma University Heavy Ion Medical Center
HIBMC	– Hyogo Ion Beam Medical Center
HU	– Hounsfield units
ID	– immobilization device
IG	– image guidance
IMRT	– Intensity Modulated Radiation Therapy
JRA	– Joint Research Activities
MEDA	– MedAustron
MR(I)	– magnetic resonance (imaging)
NIRS	– National Institute of Radiological Science
PET	– position emission tomography
RO	– radiation oncologist
RT	– radiation therapy
RTT	– radiation therapy technologist
TPS	– treatment planning system
UKL-HD	– Heidelberg Ion Therapy
UNIMAR	– University Hospital in Marburg (Phillips-University Marburg)
ULICE	– Union of Light Ion Centres in Europe
WET	– water-equivalent thickness
WHO	– World Health Organization
WP	– work package

2. INTRODUCTION

Radiation therapy (RT) is a multi-stage process which involves treatment of a wide range of cancer indications using various radiation modalities. In order to ensure that maximum tumor control is achieved with minimal risk to normal tissue, RT requires the use of best practices and a high level of accuracy at every step [1]. In particular, with the superior dose conformity enabled by modern RT techniques, like hadron therapy, a precise and reproducible application of the planned dose, at each fraction, becomes of the utmost importance.

The advantage of hadron therapy stems from a high-dose region, referred to as the Bragg peak, occurring at the end of the projectile track. The Bragg peak deposition depth (or penetration depth) is determined by the incident beam's energy and the material traversed. Therefore, not only the target's position in the radiation field, i.e. the risk of *geometric miss* (also known in photon therapy applications), but also its position relative to upstream structures, i.e. its water-equivalent depth along the beam axis, is critical for accurate beam delivery. This renders the technique sensitive to geometry changes in the irradiation field: change in the patient's external contour, target volume deformation or misalignment relative to internal structures (e.g. bone or air cavities) or external structures (e.g. table top or immobilization device) may impact the beam penetration depth and, potentially, lead to dosimetric errors¹.

This requires reproducible patient positioning during the treatment planning and delivery process, in terms of both patient setup and internal organ motion, and introduces additional requirements on the immobilization equipment. It should be noted, that these concerns also potentially undermine the applicability of target-based image guidance (IG), the state-of-the-art solution employed widely in photon treatments, rendering hadron therapy more dependent on effective patient immobilization.

Patient immobilization is achieved by means of specialized equipment, referred to in the following as immobilization devices (IDs). The aim of patient immobilization is twofold: (1) it allows fast and reproducible setup of the patient for imaging/simulation procedures and, subsequently, for each treatment fraction, by establishing a relationship between the external markers and internal structures and (2) it helps to maintain patient position during the application of radiation, by constraining patient movement. Additionally, in some situations, immobilization aids to achieve an advantageous treatment position.

The consequences of incorrect positioning fall into two main categories: (1) missing the target, which may lead to tumor underdosage and potentially compromise tumor control and (2) unintended application of increased dose to surrounding normal tissues, which in turn may increase side effects [1,2]. As both of these effects can potentially affect the individual patient treatment outcome, it is necessary to optimize the immobilization technique and to assess the magnitude of the unavoidable residual uncertainties, that can be e.g. incorporated into safety margins or robust planning techniques. Last but not least, if significantly variable between the institutions, the dosimetric consequences of positioning uncertainties can also confound outcome of clinical trials and inter-comparison of results, which emphasizes the importance of standardized immobilization protocols.

¹ These aspects have been extensively studied within ULICE WP5 and the interested reader is referred to the respective project deliverables [3,4] and publications [5-8].

3. PURPOSE OF THIS DOCUMENT

This document presents a set of site-specific patient immobilization recommendations for application in hadron therapy. It is intended as a compendium for professionals of various disciplines, constituting the radiotherapy treatment teams at hadron therapy facilities, with an aim to support an optimal selection and implementation of the most appropriate immobilization techniques in different clinical situations and hence, to contribute to ensure the highest treatment quality standards.

The objective of this document was to:

- document the existing immobilization practices in hadron therapy in order to facilitate their implementation within the community;
- propose *best practices*, i.e. best features from existing facilities;
- and define minimum standard requirements, which should become the basis for accreditation of future facilities to participate in multicentric European clinical trials in hadron therapy.

The present report is based on²:

- a set of immobilization protocols collected in the framework of ULICE WP10
- and the results of a survey on immobilization approaches performed within the framework of ULICE WP10 via a dedicated questionnaire (*Appendix A*).

which were provided by the institutions associated within the ULICE consortium, currently in clinical operation (*CNAO, UKL-HD*) or in advanced stages of preparation (*MEDA, UNIMAR*), as well as by the courtesy of institutions external to the ULICE consortium, but having relevant expertise (*GHMC, HIBMC, NIRS*). Furthermore, the document is complemented by:

- knowledge collected through scientific visits of the contributors to other institutions;
- the outcome of a literature review on tumor-site-specific immobilization approaches and their achievable accuracy, performed within the ULICE WP5 and constituting the deliverable report D.JRA.5.1 [9], with particular consideration of studies published by hadron therapy facilities;
- and established recommendations applied in high precision photon treatment techniques [10,11].

The scope of this report includes both the established and the emerging treatment hadron therapy indications, with the exception of pediatric treatments. This collective was not included since the institutions contributing protocols and survey forms declared no pediatric treatments at the time. Furthermore, while it is recognized, that treatment techniques already established in treatments of adult patients should be translated to pediatric patients [12,13]. The latter patient collective is characterized by such heterogeneity in terms of anatomical dimensions, possible non-compliance issues and other factors (e.g. need of anesthesia during irradiation), that it escapes standardization of the treatment aspects described in this document.

2 UKL-HD, CNAO, MEDA - protocols and survey not provided

4. PROTOCOL DESIGN PRINCIPLES

Among the principles which guided the design of this protocol were:

- to determine which setup, understood as the patient position (e.g. prone vs. supine) and the employed immobilization devices, provides the best immobilization accuracy;
- to take into account hadron therapy-specific issues;
- to achieve the highest possible standardization;
- and, simultaneously, to keep enough flexibility to account for facility-specific design issues.

The achievable reproducibility of patient positioning, obtained with various IDs, has been extensively reported in the literature. Only a few studies however, provide direct comparison of various immobilization solutions. Inter-comparison of the results reported in individual studies is, on the other hand, confounded by several factors, like: (usually) small patient cohorts, differences in the methodology and workflow, and, finally, methods of analyzing and reporting of the acquired data. Therefore, the accuracy data reported in this document, justifying the choice of the most effective solutions, is based on the results of a meta-analysis performed in the ULICE deliverable report D.JRA.5.1 [9]. One additional factor that has been recognized is that, in order to ensure reproducible treatment position, the setup should be possibly comfortable for the patient and not overly complex to attain for both, the patient and the attending personnel [2].

As outlined in section 1, in addition to the geometric miss, known from photon therapy applications, the sensitivity of the particle range to the changes in patient contour or target position along the beam axis poses additional requirements for immobilization solutions. Some generic comments regarding this issues were therefore summarized in a dedicated section (5.1.3) and the compatibility of the immobilization solutions with hadron therapy was included as a criterion in the formulation of the site-specific recommendations (5.2.1 - 5.2.5).

The questionnaires as well as other data sources used in this document, were evaluated with an emphasis on identification of common features, to allow formulation of standardized, best practice guidelines. At the same time, the proposed procedures were kept flexible and should be adapted in each individual hadron therapy center, in order to develop detailed setup and immobilization protocols fully tailored to: (1) facility-specific design/workflow issues (e.g. use of in-room or off-line immobilization/positioning in combination with a shuttle system, presence of gantry or use of couch roll/pitch), (2) clinical concepts (e.g. fractionation schemes, motion management concepts, etc.) and (3) other particular aspects, like the patient's condition.

Additionally, since it is apparent that external immobilization alone is not sufficient to ensure perfect setup reproducibility, suggestions have been formulated on application of repeat imaging to control patients setup and enable treatment plan adaptation (e.g. in case of considerable changes in patient's anatomy).

5. IMMOBILIZATION PROTOCOLS

5.1. General considerations

Several generic considerations, exceeding the strict scope of the site-specific protocols, but crucial to the entire workflow as a whole, are outlined in this section.

5.1.1. Patient support

Nearly all hadron therapy facilities use fixed beam lines for beam delivery³. This limits the choice of irradiation directions, which is often compensated for by using a variety of treatment positions (supine, prone and even sitting), as well as by using special patient support units with roll/pitch features to gain additional flexibility. Two types of patient supports are currently in use: (1) a flat table top, similar to advanced conventional solutions (CNAO, HIBMC, MEDA, UKL-HD, UNIMAR) and (2) a special half-pipe with a rolling mechanism called *patient cradle* or *pod* (GHMC, NIRS) (Fig. 1).

Regardless of its conceptual design, the patient support has to afford uncompromised stability and rigidity (minimal bending, even at high loads). At the same time, as discussed below, it should employ low density materials, possibly homogeneous or with smooth density changes and no sharp edges (no bore holes, no inserts or metal inclusions) within the treatment area.

Finally, the patient support should be equipped with an indexing system, through which the IDs and/or other accessories can be attached to it at well-defined, reproducible position, to reduce daily variations in patient repositioning and to minimize systematic errors from variable couch/cradle sag (due to variability in patient's weight distribution) [2]. Such indexed patient setup system also facilitates absolute positioning procedure and setup accuracy recording via an oncology management system [2].



Figure 1. a) Flat table top (indexing system and standardized knee and feet supports visible) at HIMBC facility; b) Rotating patient cradle (installed in CT room) at GHMC facility.

³ Although proton gantries are a commercially available and affordable standard now, almost all currently operational proton facilities still have some number of treatment rooms equipped with fixed beams only. Among heavier ion facilities instead, where the gantry design is still a challenge, only one prototype gantry exists [14].

5.1.2. Ensuring immobilization through the radiotherapy process

Reproducible patient positioning is essential at each stage of the radiotherapy process. This requires standardization of the immobilization procedures and compatibility of used immobilization gear, in particular with imaging devices (e.g. MRI/PET) in terms of size (e.g. limited scanner bore, limited field of view), induction of imaging artifacts (e.g. metallic elements in MRI/CT), and safety (e.g. metallic elements in MRI). The latter two are usually ensured by the vendor of immobilization equipment through actual ID design or supply of a compatible ID version.

Reproducibility of the patient position between the treatment and imaging is of particular concern in facilities relying on roll/pitch solutions (e.g. a rotating cradle). As organ movement and deformation due to the inclined positioning may appear, invalidating the use of conventional treatment planning CT in supine position, exact compatibility of the systems must be ensured, including the installation of roll/pitch systems at the CT (Fig. 1).

Last but not least, in centers providing other treatment modalities, uniformity of the immobilization solutions between modalities is recommended. This allows to maintain the same patient position for treatment planning with other modalities, which facilitates dose accumulation (e.g. in combined-modality boost scenarios). Furthermore, unless a new planning CT is rendered necessary by significant anatomical changes, this approach reduces unnecessary imaging dose to the patient, eliminating the need for planning CTs to be repeated [15]. Finally, it reduces the demands on staff, both in terms of training (one set of immobilization procedures to learn) and daily workload (one ID to manufacture for each patient) [15]. The latter, along with simplified maintenance and storage, translates additionally into financial savings. (TODO: remove the last sentence?)

5.1.3. Hadron therapy specific considerations

Two main aspects, unique to hadron therapy, are to be considered here: (1) the traversed densities determine the beam penetration depth and (2) hadron beams, especially proton beams, undergo scatter when traversing matter, which degrades their physical properties (range straggling and increase of lateral penumbra). Therefore:

- presence of any objects in the way of the irradiation beam should be avoided or, if it is necessary, these objects should be translucent or with accurately known water-equivalent thickness (WET) and high radiological homogeneity;
- in particular, presence of sharp edges (density interfaces) within the field, along the irradiation direction should be avoided;
- objects present in the field during irradiation must be encompassed entirely in the planning CT
- in proton treatments, immobilization should allow patient setup as close as possible to the treatment nozzle.

Range uncertainties

For objects which may be traversed by the irradiation beams, i.e. patient support devices (table top, base plate or pod) and immobilization accessories (head supports, vacuum pillows), the water-

equivalent-thickness should be as low as possible (to minimize the range uncertainty and the effect of range straggling) and should be accurately known. This implies, that, in addition to the requirement of identical positioning at each stage of the RT process (section 5.1.1.), ensured by identical size and shape of the devices, treatment IDs should have the same composition as those used in the imaging rooms, as a variation in these parameters can impact the beam range. Ideally, the same equipment used for imaging should be used in the treatment room, in order to avoid the uncertainties stemming from part-to-part variability [15]. However, with the exception of devices which are purposely patient-specific (masks, custom pillows), it is difficult and impractical to implement due to a significant demand on ID transport and the storage space. Instead, interchangeability of such devices must be ensured.

Furthermore, the density of IDs may lay outside of the Hounsfield unit (HU) calibration curve and, in order to be considered correctly by the treatment planning system (TPS), its water-equivalent thickness has to be established via measurement. Such data, along with the CT check of the device homogeneity, can be used as reference for long term stability checks [15].

Device non-uniformity and edge effects

The device non-uniformity is of concern in hadron therapy as, while it may be considered correctly by the TPS, a shift of the target volume relative to an inhomogeneity may modify the beam range and, hence, the delivered dose. In particular, this excludes patient support systems reinforced by metal elements within the potential treatment area.

Radiological homogeneity of standardized devices, which may be traversed by the irradiation beams, i.e. patient supports (table top, base plate, pod) and immobilization accessories (e.g. standardized head rests) should be evaluated prior to their application.

Other IDs, in particular individually-molded ones, such as thermoplastic masks or vacuum pillows, may exhibit various amount of inhomogeneities (i.e. folds, air pockets), depending on the complexity of the area immobilized and, to some extent, on the experience of the personnel manufacturing them [15]. While these devices are indispensable in hadron therapy, guidelines should be developed, based on daily practice, to limit the extent of this problem and, in particular, to avoid highly inhomogeneous structures in the beam path.

Another aspect specific to hadron therapy is the potential modulation of the particle range by the mask perforation, not accounted properly in the planning systems due to the limitations of the dose computation algorithms as well as the discrete nature of the data (CT and dose grid resolution). Since the main rationale for use of mesh masks, that is the skin sparing effect, is not relevant in hadron therapy and *solid* or *non-mesh* masks potentially offer greater stability, the majority of surveyed centers declared use of such unperforated masks (CNAO, GHMC, HIBMC, NIRS, UNIMAR). However, some facilities (UKL-HD) use mesh masks, among other reasons, for the sake of compatibility with photon treatments.

The presence of a pronounced density interface (e.g. ID edge) along the beam direction can be considered a special case of device non-uniformity issue. Even a small displacement of the patient (or target) relative to such edge may cause a significant change in the particle range, determined by the length of the edge and the density difference (typically relative to the air density).

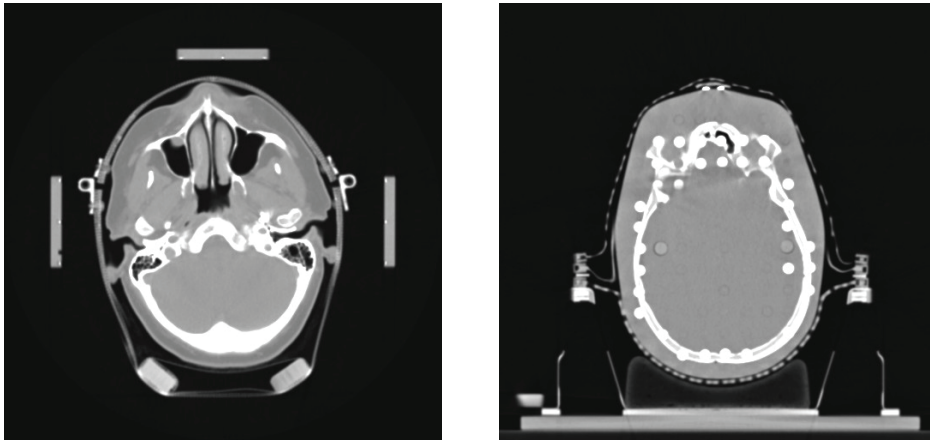


Figure 2. a) A potential drawback of Scotch cast masks is the presence of locks to close the halves of the mask and gap between them, often located in the potential irradiation field; b) A potential drawback of stereotactic thermoplastic masks is the presence of horizontal bars connecting the halves of the mask, often located in the potential irradiation field.

Some immobilization devices, currently on the market, contain such edges by design (see Fig. 2), limiting the choice of irradiation angles. While this may be compensated by the flexibility afforded by a gantry, it renders these systems unsuitable for facilities equipped with fixed (usually horizontal) beams only. Largely for this reason stereotactic head frame systems and systems employing bite blocks mounted on a support arm are not employed by the surveyed facilities.

Beam broadening

When traversing the matter, particle beams undergo gradual lateral broadening resulting from multiple Coulomb scattering and nuclear interactions. Therefore, items, which may be traversed by irradiation beams (table top, base plate or pod, immobilization accessories), should be possibly light-weight and their water-equivalent thickness should be as low as possible. As these characteristics are desirable also for applications in photon therapy, it is commonly ensured by the ID manufacturers (e.g. carbon fiber couch tops with foam core, vacuum pillow filling etc.).

In addition, at treatment facilities employing scanned beam delivery, particle beams, in particular proton beams, undergo scattering already within the beam delivery and monitoring systems of the treatment nozzle, which results in degradation of their lateral penumbra and significant beam broadening. In order to limit further degradation of the pencil beam size due to the geometrical beam divergence, and the associated loss of dose conformity [16], the *air gap*, i.e. the distance between the nozzle and the patient should be kept as short as possible, which should be taken into account in the design of patient positioning and immobilization systems.

Constancy in time

Another aspect, not exclusive to hadron therapy, but potentially more critical, is the long-term stability of the devices. It has been already signaled above, that properties of the IDs such as shape, composition and uniformity should be regularly checked in order to determine if any changes have occurred as a result of wear or damage [15].

Furthermore, some attention should be given to IDs which temporarily change their properties during the process of fabrication (become moldable and rigid again), like thermoplastic masks or water-activated molds. For instance, the former may exhibit some degree of shrinkage in the process of solidification. The manufacturing guidelines should ensure, that the shape of the mask doesn't change after the planning images have been acquired, e.g. by suggesting the time that the freshly molded mask should remain on the patient and determining a minimum time between mask molding and the acquisition of the treatment planning CT images. Water-activated materials may in turn retain some amount of water for a period of time after the molding, even after the device has already hardened, as demonstrated experimentally by Wroe *et al.* [15]. This may result, if the ID is imaged in this phase, in foci of density significantly higher than the intended one in the planning CT, which will not be present during the treatment, and hence alter the particle range.

In recognition of these issues, all polled institutions declared that the ID manufacturing should take place in a dedicated session, prior to the acquisition of the planning CT.

Imaging artifacts

Hounsfield units deduced from the planning CT images are the basis for dose calculations in RT. While the presence of imaging artifacts falsifying the HU distribution is undesirable in conventional treatments as well, in hadron therapy its consequences may be more critical.

Imaging artifacts resulting with incorrect reconstruction of HU distribution, such as streaking artifacts from high-Z materials, introduce errors in the particle range computation and lead to incorrect dose distributions to be planned for the patient. Presence of such elements, e.g. metal screw employed in a Lok-Bar shown in Fig. 3a, should be avoided around the regions of the body which will be traversed by the treatment beams. Another potential problem, associated with the fidelity of planning CT data comes from the limited CT reconstruction diameter, which may result with parts of larger IDs (e.g. vacuum cushion) not being encompassed in the field of view (Fig. 3b), and hence not accounted for in particle range calculation.

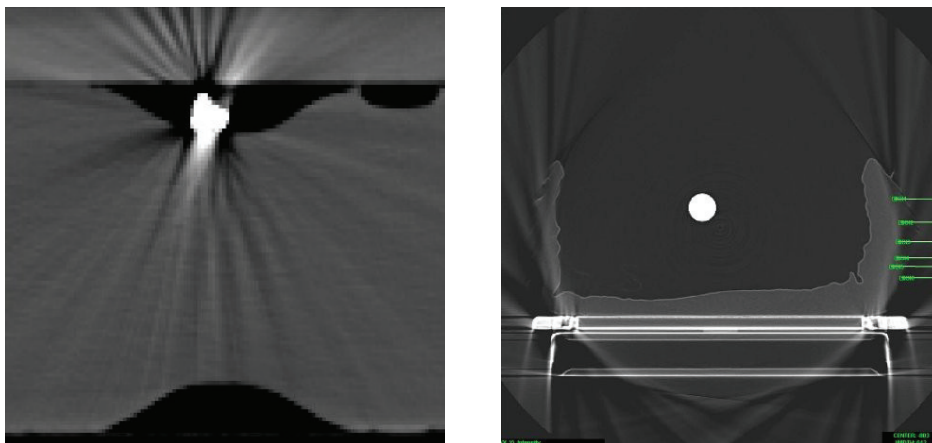


Figure 3. a) Streaking artifacts from high-Z materials of the pins used in a commercial immobilization accessory (Lok-Bar); b) Artifact deriving coming from the CT reconstruction diameter (significant part of the cushion lies outside the reconstructed field of view).

5.1.4. Desirable characteristics of immobilization device(s)

The points considered in optimal ID choice included:

- accuracy, i.e. secure the patient and constrain motion;
- durability, i.e. ID maintains integrity throughout the treatment course;
- no interference with simulation, localization and treatments, i.e. minimal perturbation of the beam (no artefacts in image acquisition, no perturbation of the dose);
- modifiable during the treatment course if necessary;
- patient comfort;
- ease of use;
- ease of manufacturing;
- cost;
- re-usability;
- minimal storage space.

Attainable immobilization efficiency and durability of the ID were ranked, by the institutions who filled out the survey, as the most important properties, followed by comfort, low attenuation levels and possibility of modification. Re-usability and cost, in turn, were declared as the least important factors, although in detailed sections of the questionnaire, some facilities declared partial ID re-use (e.g. of vacuum pillows).

5.1.5. Staff - responsibilities and training

It must be emphasized, that the final accuracy obtained, is determined by the proficiency of the personnel manufacturing and/or applying the IDs and influenced by the cooperation of the patient [2]. Special attention has to be given to patient selection and compliance assessment, as many factors may impede patient's ability to be correctly positioned and immobilized, including: co-morbidities (e.g. pain, difficulty in breathing), inability to follow instructions (e.g. poor communication, confusion) and psychological barriers (e.g. claustrophobia) [2,17]. Furthermore, patient's current medical status should be regularly re-assessed as, for instance, increased pain, adverse radiation reactions or the occurrence of unrelated conditions during treatment may also influence setup reproducibility [2].

All polled institutions declared the responsibility of radiation therapy technologists (RTT) for manufacturing of the IDs. Additionally, some facilities declared (often not mandatory) presence and/or approval of the ID by a radiation oncologist (RO). The *ASTRO Practice guideline for intensity modulated radiation therapy (IMRT)* [10] defines their respective roles as following:

- RTT: to understand the proper use of the patient immobilization/repositioning system and fabricate and understand the proper use of devices;
- RO: to participate in and approve the immobilization/repositioning system in consultation with other members of the team.

The duration of the ID manufacturing session, as declared by participants of the survey, typically amounted to 30 minutes for an adult patient (range: 10-40 minutes).

5.1.6. Other aspects of positioning reproducibility

It is important to note that the immobilization process is complementary to the image guidance strategy, and so, the choice of the optimal patient fixation protocol must be compatible with other aspects of the whole patient positioning workflow such as the frequency and type of localization imaging, the definition of the repositioning threshold e.g. tolerance in the residual positioning error, the use of intrafractional patient position surveillance systems, intended margin reduction, etc. In particular, all centres participating in the survey, declared the use of daily 2D (orthogonal X-ray) or 3D (cone-beam CT) imaging and setup correction via a table (usually robotic) shift.

Additionally, it is also apparent that external immobilization alone is not sufficient to control the patient setup if the anatomy changes during the course of treatment. Such changes lead to inter-fraction movements which typically increase over several fractions, possibly leading to time trends in systematic setup errors. Therefore, modern workflows should include repeated imaging during the course of treatment and, when necessary, adaptive planning strategies and therefore suggestions in this respect have been formulated.

Finally, external immobilization cannot prevent internal organ movement and organ deformations, both of which may occur intrafractionally. Considerations and possible solutions, e.g. by means of invasive devices or medical procedures (e.g. breathing techniques for thorax or bladder and/or bowel preparation for pelvic treatments) are reported in the sections dealing with indications for which this applies. It should be noted, that these techniques require adequate patient information and cooperation (or even exercise) in order to contribute to improved positioning reproducibility [2].

5.1.7. Standardization issues

Although the facility design will ultimately determine the details of the selected immobilization approach, some aspects of the process do offer possibilities for standardization.

One aspect of this is the dismissal of in-house solutions. While it should be acknowledged that, historically, institutions who pioneered in the field on hadron therapy often developed or adapted their own prototype immobilization devices [e.g. 18], in general, the facilities which provided the data for this protocol, preferred commercial solutions over homemade IDs (with some homemade solutions acceptable in special cases). Furthermore, although not directly specified in the survey, procedures employed in the polled facilities involve also the use of standardized devices such as axillary elements (feet supports, knee supports etc.) complementing the customized main ID.

Finally, owing to different challenges posed by various tumor locations, the required accuracy of immobilization will vary depending on anatomical site and planning margins. Hence the selected immobilization solutions are indication-specific. For each indication, certain flexibility must exist in order to adapt the ID to specific patient conditions (e.g. in case of problems with overhead arm position, or with prone/supine position). As mentioned previously, pediatric patients constitute a special case due to a number of reasons: among others, collective-specific (and highly variable) anatomical

dimensions and proportions, possible non-compliance with immobilization and treatment, the common requirement of irradiation under anesthesia. As such, they are not considered in this report.

5.2. Indication-specific immobilization protocols

This section details site-specific protocols for immobilization. Based on the data provided by the survey participants and driven by different indication-specific challenges for immobilization, five types of immobilization, corresponding to different body regions were identified:

- intracranial treatments,
- head-and-neck treatments,
- thorax, mediastinum and upper abdomen treatments (esophagus, pancreas, liver),
- lower abdomen/pelvic treatments (prostate, bladder, gynecological and colorectal treatments),
- paraspinal treatments.

In the following, for each group of indications, (1) the types of positioning uncertainties are signaled, (2) the magnitude of the residual uncertainties, despite use of state-of-the-art immobilization approaches, is reported, (3) the recommended immobilization approach is presented and (4) additional considerations are addressed and further recommendations given.

5.2.1. Intracranial treatments

Source(s) of positing uncertainties

Rigid setup errors (translational and rotational).

Required/expected repositioning precision and accuracy

State-of-the-art non-invasive head immobilization systems offer reproducibility within 1-2 mm, with a slight advantage of stereotactic mask systems when compared to plain thermoplastic masks and further advantage of bite block systems. For more details, see D.JRA.5.1 Table 1 [9].

Immobilization strategy

Direct immobilization of the skull or of surrogates, like maxilla or nasal bridge, to limit rigid translational and rotational degrees of freedom.

Recommended immobilization approach

Typically, the patients are immobilized in supine position, which offers greater comfort for the patient and is simpler to manage for the personnel. In some cases, especially for treatment of posterior lesions (in particular at facilities not equipped with a rotational gantry), prone position may be necessary.

All polled centers report the use of thermoplastic masks for intracranial treatments. Various solutions have been described in the literature, which employ different materials of varying thickness and with various fixation systems, however the use of non-mesh material is declared by majority of centers to

avoid particle range uncertainty induced by mask material perforation (see section 5.1.3). The masks are molded to the patient's facial features (nasion, chin) (Fig. 4). Usually no openings are made for the eyes. The positioning reproducibility of the mask is influenced by the number of fixation points of the shell to the table top or base board. Owing to substantial differences in the facility designs, no uniform solution can be proposed for the mask shell fixation, and systems in application range from masks wrapped around the patient and the couch (GHMC, NIRS), through masks fixed by frame (CNAO, UKL-HD) or L-shaped profiles (HIBMC), to solutions with push pin fixation (UNIMAR). Patient features visible through the mask are usually painted on the surface of the mask to aid reproducible mask placement. At some centers (HIBMC, NIRS, UNIMAR), the reproducibility of the head tilt is improved by application of upper jaw fixation by means of custom mouth pieces molded of the same material and integrated into the mask (as opposed to frame based bite blocks) [9]. (TODO: MEDA?)

Majority of participating centers declared use of individually molded head rests, e.g. Moldcare (Bionix Radiation Therapy) or Vaclock pillows (Civco Medical Solutions), to improve stability against misalignment and rotations, assuring reproducible head 'nod' and neck curvature (CNAO, GHMC, HIBMC, NIRS, UNIMAR). However some institutions rely (at least partially) on standardized supports (UKL-HD, UNIMAR).

Furthermore, all centers use custom (GHMC, NIRS) or standardized (HIBMC, UNIMAR) feet and knee supports to ensure patients comfort and improve overall position reproducibility, also outside of the irradiated regions. (TODO: CNAO? MEDA? UKL-HD?). To facilitate their reproducible application, surveyed centers recommend to mark the patients outline on the non-reusable supports.

Special considerations

- Masks should not be used (in particular, imaged for treatment planning) immediately after manufacturing, as there may be material shrinkage of up to 2 mm in the first 24 hours [12];
- Accuracy may be compromised by patient non-compliance e.g. inability to remain still for the treatment duration, due to problems such as neurological deficit, nausea, anxiety or claustrophobia. These patients should be identified prior to treatment and the problem resolved or an individual solution (and/or planning margin) used [12].



Figure 4. Thermoplastic masks for intracranial treatments: a) at CNAO facility, note: non-mesh material, no openings for eyes; b) at HIBMC facility, note: non-mesh material, no openings for eyes, patient's features painted on the mask and upper jaw fixation mold.

Additional comment(s)

Relocatable stereotactic frames can deliver a higher precision in repositioning, however due to relative complexity of use and additional factors (e.g. the frame limiting the irradiation directions, sharp edges within the irradiation field introducing particle range uncertainties) stereotactic systems are not used in any of the centers participating in the survey. However, in the future, for radiosurgical treatments and for application in benign ailments (like arteriovenous malformations or trigeminal neuralgia), a table-top stereotactic immobilization system is envisioned at UNIMAR.

Hadron therapy institutions participating in the survey declared also no use of dental fixation (bite block) as it also contains a support frame or arm, limiting the irradiation directions. However, some proton centers, benefiting from the additional beam setup flexibility through a rotational gantry, often use such solutions, e.g. vacuum-enforced dental molds, registered to the maxilla and thus in direct mechanical contact with the cranium [19,20].

Further recommendations

Image guided patient setup is mandatory and repeated volumetric imaging is useful to monitor for possible mispositioning trends over the treatment course, such as changing fit of the immobilization device from weight loss, swelling or hair loss [2].

5.2.2. Head-and-neck treatments*Source(s) of positioning uncertainties*

Rigid setup errors (translational and rotational), non-rigid deformations of the neck region and other anatomical changes (tumor shrinkage, patient weight loss).

Required/expected repositioning precision and accuracy

The most common immobilization solutions for head-and-neck are based on thermoplastic masks immobilizing the patient's head and applied in combination with various solutions to ensure reproducible placement of neck and shoulders. Although the overall reported precision of such systems is in the order of 2-3 mm, detailed studies have revealed significantly larger, semi-independent local deviations, e.g. in the region of mandible and caudal cervical spine [21,22]. For more details see D.JRA.5.1 Table 3 [9].

Immobilization strategy

Immobilization of the skull via surrogates like maxilla or nasal bridge to limit rigid translational and rotational degrees of freedom. Neck rest to ensure reproducible flex. Shoulder depression systems suppressing shoulder position variability.

Recommended immobilization approach

The patients are immobilized in the supine position by means of a rigid thermoplastic mask, encompassing head, neck and shoulders, in combination with carefully chosen head rests, preferably individually formed, and shoulder depression systems or customized molds suppressing shoulder

position variability.

Various solutions have been described which employ different materials of varying thickness, however the use of non-mesh material is declared by majority of centers to avoid particle range uncertainty induced by mask material perforation (see section 5.1.3). The masks are molded to the patient's facial features (nasion, chin) and encompass the shoulders (Fig. 5). Usually no openings are made for the eyes. Owing to substantial differences in the facility designs no uniform solution can be proposed for the mask fixation to the base board, and systems in application range from masks wrapped around the patient and the couch (GHMC, NIRS), through masks fixed by frame (CNAO, UKL-HD) or L-shaped profiles (HIBMC), to solutions with push pin fixation (UNIMAR). Patient features visible through the mask are usually painted on the surface of the mask. Similarly to cranial irradiations, the reproducibility of the head tilt is ensured, as employed by some centers (NIRS, HIBMC, UNIMAR), by application of an upper jaw fixation by means of custom mouth pieces molded of the same material and integrated into the mask (as opposed to a frame-based bite block) [9]. (TODO: MEDA?)

Majority of participating centers declared use of individually molded head rests, e.g. Moldcare (Bionix Radiation Therapy) or Vaclock pillows (Civco Medical Solutions), to improve stability against misalignment and rotations, assuring reproducible head 'nod' and neck curvature (CNAO, GHMC, HIBMC, NIRS, UNIMAR). However some institutions rely (at least partially) on standardized supports (UKL-HD, UNIMAR). (TODO: MEDA?)

Furthermore, all centers use custom (GHMC, NIRS) or standardized (HIBMC, UNIMAR) feet and knee supports to ensure patients comfort and improve overall position reproducibility, also outside of the irradiated regions. (TODO: CNAO? MEDA? UKL-HD?) To facilitate their reproducible application, surveyed centers recommend to mark the patients outline on the non-reusable supports.

The actual head tilt and neck curvature, e.g. flexed, neutral or extended should be determined by the primary site of irradiation and thus orientation of treatment beams and specified at the time of manufacturing the immobilization device. Alternatively, multiple IDs should be prepared with various neck positions and the optimal one selected at the time of treatment planning.

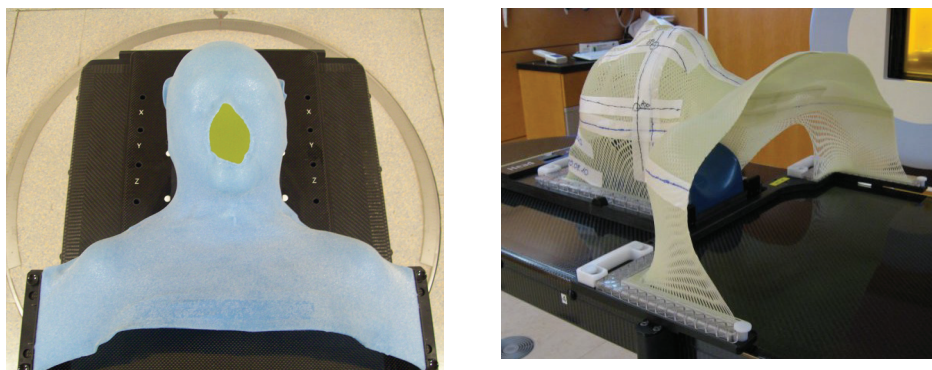


Figure 5. Thermoplastic masks for head-and-neck treatments: a) at UNIMAR facility, note: no openings for eyes, non-mesh material, push pin fixation; b) at UKL-HD facility, note: mesh material, fixation frame [18].

Special considerations

- Mask should not be used (in particular, imaged for treatment planning) immediately after manufacturing, as there may be material shrinkage of up to 2 mm in the first 24 hours [12];
- Accuracy may be compromised by patient non-compliance e.g. inability to remain still for the treatment duration, due to problems such as neurological deficit, nausea, upper respiratory tract dysfunctions, upper digestive tract discomfort (e.g. xerostomia), anxiety or claustrophobia. These patients should be identified prior to treatment and the problem resolved or an individual solution (and/or planning margin) used [12].

Additional comment(s)

Hadron therapy centers participating in the survey, but also other institutions [19], declare no use of dental fixation in head-and-neck treatments, as target volumes encountered in these cases commonly include the upper jaw level, rendering them inaccessible to irradiation without an interference between the beam and bite block support.

Further recommendations

Image guided patient setup is mandatory and intrafractional position verification may be necessary [12]. Furthermore, repeated volumetric imaging is recommended to monitor for trends over the treatment course, as treatment side effects impact on both the tolerance to treatment itself and the nutritional status of patients, which can result in edema, tumor regression and weight loss, changing fit of the immobilization device and hindering the position reproducibility. In critical cases a new ID and, in consequence, a new treatment plan may be required.

5.2.3. Thorax, mediastinum and upper abdomen treatments*Source(s) of posing uncertainties*

Rigid and non-rigid setup errors, internal anatomy changes, respiration- and cardiac cycle-induced intrafraction motion.

Required/expected repositioning precision and accuracy

The limited amount of data currently available indicates, that setup errors in lung or upper abdomen irradiations can amount to up to 6 mm with state-of-the-art immobilization systems (e.g. whole body vacuum cushions). For more details, see D.JRA.5.1 Table 7 [9].

Immobilization strategy

External immobilization can be used to reduce the setup error component, however it is limited by the lack of rigid anatomic reference structures. Overall position can be defined to some extent by aligning and immobilizing the pectoral and pelvic girdle and by fixation of the lower extremities. Additionally, reproducible patient external contour should be ensured by means of a device constraining it to a predefined shape.

Recommended immobilization approach

In lung, mid and lower esophagus, liver and pancreas treatments, patients should be positioned supine with both arms above the head, as this position grants greater freedom in choosing beam setups [2]. Reproducible arm positioning and patient's comfort may be enhanced employing an arm support. Exceptions are apical tumors and tumors located in the upper third of the esophagus where immobilization with arms down, complemented with a thermoplastic mask immobilizing head and shoulders, may be more appropriate [2].

The use of a whole body mold for external patient immobilization, especially in stereotactic treatments, is recommended by the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) [11]. Presumably, such devices can be implemented with their full advantages only at institutions equipped with reclining tables (UNIMAR, [23]), making stepping in and out of the device easier for the patients and helping to avoid deformations of the mold over the course of treatment. Alternatively, as reported in the survey, combination of multiple customized cushions (e.g. Moldcare, Bionix Radiation Therapy) and customized or standardized knee/feet supports offers sufficient treatment reproducibility (GHMC, HIBMC, NIRS) (Fig. 6). At NIRS and GHMC facilities, these molds are placed inside the patient cradle (which additionally contributes to maintain the external patient contour), while in other centers they are attached to the flat table top. To facilitate their reproducible application, surveyed centers recommend to mark the patients outline on the non-reusable supports.

To improve positioning accuracy, but also to ensure reproducibility of the external patient contour, nearly all polled institutions employ thermoplastic body masks (Fig. 7a). The use of non-mesh material, to avoid particle range uncertainty induced by mask material perforation (see section 5.1.3), is declared by majority of centers. Owing to substantial differences in the facility designs no uniform solution can be proposed for the mask shell fixation to the base board, and systems in application range from masks wrapped around the patient and the couch (GHMC, NIRS) to solutions with various types of mask fixation to the base board / table (CNAO, HIBMC, MEDA?, UKL-HD, UNIMAR).

In come cases, considering the technical limitations of fixed beams, multiple immobilization devices with patient immobilized in various positions, may need to be manufactured for a single patient and the optimal one selected at the time of treatment planning.

Special considerations

- Pay special attention to getting the patient in and out of the mold since this can hinder the stabilizing effects of the devices;
- The stability of IDs, with particular attention to vacuum cushions, in case of treatment couch movements that include roll and pitch should be assessed;

Additional comment(s)

At some proton facilities *Pods* are used, half-pipes filled with an individually formed mold extending from the head/neck region to the knees, for thoracic and pelvic treatments, to obtain both, immobilization and reproducible patient contour [20].



Figure 6. Customized cushions a) at HIBMC facility; b) at NIRS facility (note: patient's outline marked on the cushion).

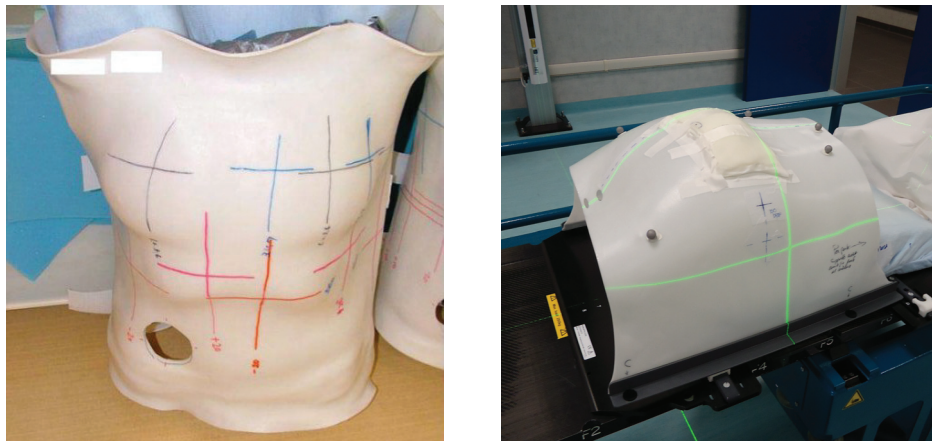


Figure 7. Thermoplastic body masks a) at NIRS facility (here: supine position); b) at CNAO facility (here: prone position).

Further recommendations

As bony landmarks are not reliable surrogates of the target position and in appreciation of the amount of possible internal anatomy changes, which can influence the particle ranges in the patient (e.g. tumor shrinkage, patient's weight gain/loss, tumor baseline shift), the daily patient positioning procedure for thoracic treatments must include verification by means of volumetric imaging modalities. In critical cases a new ID and, in consequence, a new treatment plan may be required.

Furthermore some respiratory motion mitigation techniques are indispensable, as the immobilization alone cannot guarantee stable tumor position during the treatment. It is particularly important for scanned beam applications where the interplay between patient movement and beam scanning may lead to a deterioration of the dose distribution. Furthermore, in addition to conventional geometrical miss, target motion relative to upstream structures may lead to the change of its water-equivalent depth. Detailed discussion of available options is beyond the scope of this document, however it should be noted, that some such systems may require placement of additional equipment around the patients chest

(e.g. pressure belt, infrared-reflecting block). It is mandatory, that such elements are placed outside the treatment field, to avoid introducing range uncertainty [15,20].

5.2.4. Lower abdomen/pelvic treatments

Source(s) of positing uncertainties

Rigid and non-rigid setup errors, inter- and intrafraction internal anatomy changes (organ movement e.g. as a consequence of respiratory movement, peristaltic movement, different bladder and rectum filling, etc.) Inter- and intrafraction internal target/organ motion can be expected for prostate, but also for cervix/uterus, bladder and rectum irradiations.

Required/expected repositioning precision and accuracy

The majority of published studies regarding patient immobilization in the pelvic area are based on data acquired in prostate treatments and report setup errors in the order of 5 mm. Similar immobilization solutions are being used for prostate, and cervix and uterine cancer treatments, however the available literature on the latter is much sparser. For more details, see D.JRA.5.1 Table 5 [9].

Immobilization strategy

Two types of positional uncertainty, i.e. setup error and internal target movement have to be addressed in pelvic irradiations. While the former one can be effectively reduced by means of the external immobilization, the latter can be limited only to some extent, as no direct surrogates of the target position are available.

The reproducibility of patient setup can be only partially ensured by registering of stable bony landmarks, like hip bones, and fixation of the lower extremities (as leg *scissor* movement and roll have been shown to contribute to prostate rotation [24]).

Recommended immobilization approach

For prostate patients, irradiation in supine position and the use of external immobilization devices is recommended, assuring reproducible feet rotation and knees flex. Additionally, using the hands on chest position helps to avoid the weight of the arms on the trunk [25]. For patients with lower gastrointestinal (rectal) tumors, treatment in prone position with belly-board should be considered, to achieve displacement the small bowel out of the pelvis and thus, reduce potential toxicity [2].

The reviewed literature data do not clearly prove the advantage of the most common full body rigid external immobilization devices (alpha-cradle, vacuum bag) over feet and knees supports [9]. Presumably, full body devices can be implemented with their full advantages only at the institutions equipped with reclining tables (UNIMAR, [23]), making stepping in and out of the device easier for the patients and helping to avoid deformations of the mold over the course of treatment.

Alternatively, as reported in the survey, combination of multiple customized cushions (e.g. Moldcare, Bionix Radiation Therapy), extending from lower thoracic area to the mid thigh, and customized or standardized knee/feet supports offers sufficient treatment reproducibility (GHMC, HIBMC, NIRS)

(Fig. 6). At NIRS and GHMC facilities, these molds are placed inside the patient cradle (which additionally contributes to maintain the external patient contour), while in other centers they are attached to the flat table top. To facilitate their reproducible application, surveyed centers recommend to mark the patients outline on the non-reusable supports.

To improve positioning accuracy, but also to ensure reproducibility of the external patient contour, it is recommended, to combine either of the two approaches with individually molded thermoplastic pelvic masks formed around the patient's mid thorax, hips and upper part thighs (Fig. 7b). The use of non-mesh material, to avoid particle range uncertainty induced by mask material perforation (see section 5.1.3), is declared by majority of centers. Owing to substantial differences in the facility designs no uniform solution can be proposed for the mask shell fixation to the base board, and systems in application range from masks wrapped around the patient and the couch (GHMC, NIRS) to solutions with various types of mask fixation to the base board or table (CNAO, HIBMC, MEDA?, UKL-HD, UNIMAR).

In some cases, considering the technical limitations of fixed beams, multiple immobilization devices with patient immobilized in various positions (e.g. supine and prone) may need to be manufactured for a single patient and the optimal one selected at the time of treatment planning.

Special considerations

- Pay special attention to getting the patient in and out of the mold since this can hinder the stabilizing effects of the devices;
- The stability of IDs, with particular attention to vacuum cushions, in case of treatment couch movements that include roll and pitch should be assessed;
- The prone position is associated with larger setup errors and is often too uncomfortable for patients with an artificial stoma.

Additional comment(s)

At some proton facilities *pods* are used, half-pipes filled with an individually formed mold extending from the head/neck region to the knees, for thoracic and pelvic treatments, to obtain both, immobilization and reproducible patient contour [20].

The application of endo-rectal balloons (ERB) for intrafraction prostate gland stabilization may be recommended (provided compatibility with external immobilization), based on the published literature [26] and on experiences reported by several proton facilities [20, 27, 28]. Additionally, the ERB creates a homogeneous region in a structure that is relatively heterogeneous, which contributes to the minimization of range uncertainty near the target structure [15]. However, in the light of publications reporting poor reproducibility of ERB placement, position verification should be used to prevent large day-to-day variations. To avoid positioning errors caused by patient relaxation, some delay after ERB placement should be allocated before imaging and treatment.

Further recommendations

As bony landmarks are not reliable surrogates of the target position and in appreciation of possible

internal anatomy changes, which can influence the particle ranges in the patient, the daily patient positioning procedure for pelvic treatments should include verification by means of volumetric imaging modalities. Furthermore, due to substantial intrafraction organ/target motion, some form of intrafraction monitoring may be necessary [12].

Anatomical changes have to be monitored, as e.g. patient weight gain/loss, since changes in the thickness of the subcutaneous tissue can influence the particle ranges and hence lead to the deterioration of the spatial dose distribution even if positioning of the isocenter is correct. In critical cases a new ID and, in consequence, a new treatment plan may be required.

To obtain reproducibility of the internal anatomy during the course of treatment, attention to rectal volume both at planning and during treatment delivery is recommended. A minimum requirement should include a departmental protocol and patient information sheet, to ensure consistent practice before acquisition of planning CT and during treatment delivery [2]. Rectal volume should be assessed in planning CT with a pre-defined cut-off (e.g. diameter) and intervention used (enema and/or laxatives) if exceeded. However, rectal preparations may be inappropriate for patients symptomatic from their rectal cancer.

The application of a preparation protocol is also recommended to maintain reproducible bladder filling (in particular, but not only, in treatments for bladder cancer). However, while an empty bladder might be easier to reproduce, this may lead to increased dose to small bowel and bladder, and should be avoided [2]. Instead, maintaining a comfortably full bladder is recommended. The patient compliance to this preparation should be monitored.

5.2.5. Paraspinal treatments

Source(s) of positing uncertainties

Rigid translational and rotational setup errors as well as local deformations due to semi-independent movement of the vertebrae.

Required/expected repositioning precision and accuracy

The limited amount of data currently available indicates, that the setup errors in paraspinal treatments are up to 3 mm for each separate direction (and up to 4 mm in 3D) with somewhat better reproducibility in the region of cervical spine as compared to thoracic, lumbar and sacral sections. For more details, see D.JRA.5.1 Table 9 [9].

Immobilization strategy

For treatments in cervical section: immobilization of the skull via surrogates like maxilla or nasal bridge to limit rigid translational and rotational degrees of freedom and neck rest to ensure reproducible flex. Shoulder depression systems suppressing shoulder position variability.

For treatments in thoracic, lumbar and sacral sections: overall position can be defined by aligning and immobilizing the pectoral and pelvic girdle, relying on stable bony landmarks (e.g. hip bones), and by fixation of the lower extremities. Additionally, reproducible patient external contour should be ensured

by means of a device constraining it to a predefined shape.

Recommended immobilization approach

Paraspinal lesions are anatomically located in the body regions already presented, hence the same immobilization approaches are applied and will be only briefly summarized here.

For cervical spine treatments the patients are immobilized in the supine position by means of a rigid thermoplastic mask, encompassing head, neck and extending down to the shoulders, in combination with preferably customized head rests defining the neck flex and suppressing shoulder position variability. The use of non-mesh material, to avoid particle range uncertainty induced by mask material perforation (see section 5.1.3), is declared by majority of centers. Additionally, custom or standardized feet and knee supports are used, to ensure patients comfort and improve overall position reproducibility, also outside of the irradiated regions. For further details refer to section 5.2.2.

For treatments in thoracic, lumbar and sacral sections the patient may be immobilized in a supine or prone position using combination of multiple customized cushions and customized or standardized knee/feet supports. To improve positioning accuracy, but also to ensure reproducibility of the external patient contour, individually molded thermoplastic pelvic masks are formed around the patient's thorax, hips and upper part of thighs (depending on the region to be treated). The use of non-mesh material, to avoid particle range uncertainty induced by mask material perforation (see section 5.1.3), is declared by majority of centers. For further details refer to section 5.2.3 and 5.2.4.

In some cases, considering the technical limitations of fixed beams, multiple IDs with patient immobilized in various positions (e.g. supine and prone) may need to be manufactured for a single patient and the optimal one selected at the time of treatment planning.

Special considerations

- Pay special attention to getting the patient in and out of the mold since this can hinder the stabilizing effects of the devices;
- The stability of IDs, with particular attention to vacuum cushions, in case of treatment couch movements that include roll and pitch should be assessed;
- Accuracy may be compromised by patient non-compliance e.g. inability to remain still for the treatment duration, due to problems such as neurological deficit, pain or if the patient is unable to feel their position. These patients should be identified prior to treatment and the problem resolved or an individual solution (and/or planning margin) used [12].

Additional comment(s)

At some proton facilities, for paraspinal treatments patients are immobilized with a vacuum mold. Additionally, for lesions in the cervical spine a vacuum bite-block or a mask and a thermoplastic shoulder mold is used, while for treatments in the lower spine sections, a thermoplastic body mold is employed [19].

Further recommendations

In appreciation of the highly variable spine positioning and of the high precision required, regular position verification is recommended to complement the achieved immobilization. Different planning margins may be required for different spinal levels to account for increased local uncertainty.

5.3. Standardized protocol

Generic *best practices*, as determined in this report, are summarized below and an overview of treatment site-specific approaches in patient immobilization in hadron therapy is presented in [Table 1](#).

Patient support:

(preferably) robotic table

ID type:

commercial, individually customized for each patient

Recommended ID:

combination of non-mesh thermoplastic masks and molded cushions to immobilize various regions of the body

Counter-advised ID:

bite block, stereotactic frame, mesh material thermoplastic masks, rising foam alpha cradle, stereotactic mask

Most important characteristics of ID:

accuracy (secondary only to compatibility with hadron therapy)

Least important characteristics of ID:

cost and re-usability

ID manufacturing:

manufacturing by 2 trained RRTs, check and approval by RO

Place of the ID manufacturing in the RT workflow:

dedicated session prior to CT (possibly, not the same day)

Immobilization accuracy control:

daily imaging

Further recommendations:

avoid incident beams going through IDs (except for masks), avoid sharp edges in the treatment field, check time stability of IDs

Table 1. Current best practices in patient immobilization in hadron therapy.

TREATMENT SITE	RECOMMENDED IMMOBILIZATION
Intracranial treatments	Usually supine position Thermoplastic, non-mesh mask (only head) and customized head rest Additional customized or standardized supports (knees, feet)
Head-and-neck treatments	Supine position Thermoplastic, non-mesh mask (head and shoulders) and customized head rest Additional customized supports for body regions and customized or standardized supports for knees and feet
Thoracic treatments	Usually supine position Combination of customized supports for body regions and customized/standardized supports for knees and feet Thermoplastic, non-mesh body mask Motion management mandatory
Pelvic treatments	Supine or prone position Combination of customized supports for body regions and customized/standardized supports for knees and feet Thermoplastic, non-mesh body mask Patient preparation protocol or information sheet recommended
Paraspinal treatments	Supine or prone position Combination of customized supports for body regions and customized/standardized supports for knees and feet Thermoplastic, non-mesh body mask

6. IMPLEMENTATION GUIDELINES

Patient immobilization, simulation and daily positioning/localization processes must be carried out within a clearly defined structure, adhering to defined protocols. This section outlines elements that are essential to implement such process. These elements can (and should) be further adapted according to the needs of the individual institutions.

6.1. Local protocol design

Design and clinical implementation of facility protocols should be coordinated by a designated multi-professional team (radiation oncologists, radiation therapy technologists, medical physicists). The protocol should specify:

- place of the immobilization manufacturing in the RT workflow, e.g. whether the ID should be manufactured at the simulation CT session or before etc. (section 5.1.3.);
- specify the staff responsibilities, e.g. who is in charge of manufacturing the ID (section 5.1.5.);
- specify the indication-specific immobilization details (e.g. employing recommendations presented in section 5.2.);

- outline the ID maintenance and storage (e.g. application of identifying tags);
- define the ID disposal and/or re-use guidelines.

In protocol design, the potential failure risks should be identified and addressed. In particular, to ensure proper protocol definition and application, checklists are recommended. An exemplary (non-exhaustive) list is presented in [Table 2](#).

Table 2. Potential failure risks in patient immobilization process.

RISK TYPE	RISK	RECOMMENDED SOLUTION
Patient-related	Patient-related factors e.g. co-morbid disease, inability to comply with instructions	Patient selection Comprehensive assessment and documentation of difficulties Alternative, off-protocol solutions
	Patient changing position	Monitoring during treatment
Procedure-related	Incorrect identification of patient	Identity check, photo, questions requiring an active response
	Different positioning for different imaging modalities	Planning protocol checklist Independent checking
Staff-related	Failure to assess patient's current medical status	Training and competency certification Appropriate education and staffing levels
	Unnecessarily complex setup limiting reproducibility	Training and competency certification Immobilization protocols Peer review audit
	Incorrect patient positioning	Training and competency certification Independent checking Adequate staffing levels and education
	Incorrect ID position	Training and competency certification Independent checking Adequate staffing levels
	Incorrect use of immobilization device or accessories	Training and competency certification Independent checking
	Omission of accessories	Independent checking Checklist
	Wrong ID	Independent checking Application of identifying tags
	Wrong side of body (left/right)	Independent checking

Adapted after: *Radiotherapy Risk Profile WHO Technical Manual 2008* [1]

6.2. Implementation

Representatives of each of the involved professional disciplines (RRT, RO) should participate in the protocol implementation and/or acquire skills and competencies in: (1) protocol knowledge and understanding as well as (2) off-protocol decision making.

During the implementation procedure, the achievable accuracy has to be assessed and compared with the intended accuracy goal. If identified, systematic errors stemming from the ID manufacturing procedures must be eliminated/minimized by modifications to the protocol. Random errors should be minimized by detailed best practice guidelines and personal training promoting careful attention in immobilization and patient preparation techniques.

Finally, the unavoidable residual systematic and random uncertainties must be determined for all techniques in use and all anatomical sites treated and:

- constitute input to establish departmental planning margins and therefore the on-treatment verification frequency required;
- serve as a reference for quality assurance procedures;
- be used to design appropriate action level thresholds;
- be used to define methods to detect and act on gross errors.

6.3. Training

Training and competency certification has been demonstrated to improve the immobilization accuracy, and should be undertaken by all professional groups involved [29] and encompass:

- manufacturer training, covering practical aspects associated with correct use of the equipment;
- internal training, developed by each institution, covering protocol-specific aspects.

Prior to clinical use, new personnel should become familiar with the equipment and protocol e.g. by using anatomical phantoms. Competency assessment and certification can be a combination of self assessment and peer assessment. Regular updates and re-assessment of competence after a prolonged break are recommended.

6.4. Audit

The accuracy of the immobilization procedures should be monitored. Regular audits should be conducted for each treatment site in order to: (1) assess if the current practice follows the defined protocols and (2) if current setup accuracy meets the expected/required tolerance. Retrospective audit should be analyzed to identify time trends or changes in standards. Last but not least, audit should verify if current practice follows published guidelines and applies knowledge gained from current evidence.

7. REFERENCES

- [1] WHO 2008 *Radiotherapy Risk Profile WHO Technical Manual* WHO Press, Geneva, Switzerland
- [2] NHS National Cancer Action Team 2012 *National Radiotherapy Implementation Group Report: Image Guided Radiotherapy (IGRT). Guidance for implementation and use.*
- [3] Hopfgartner J 2011 Results of robustness test with respect to inter-fraction variations *ULICE deliverable D.JRA.5.2*
- [4] Hopfgartner J 2011 Protocols to decide in case of inter-fraction motion: replanning or follow inter-fraction organ motion control? *ULICE deliverable D.JRA.5.9*
- [5] Jelen U, Ammazalorso F, Chanrion M-A, *et al.* 2012 Robustness against interfraction prostate movement in scanned ion beam radiotherapy *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **84**:e257-62
- [6] Hopfgartner J, Stock M, Knäusl B, *et al.* 2013 Robustness of IMPT treatment plans with respect to inter-fractional set-up uncertainties: Impact of various beam arrangements for cranial targets *Acta Oncol* **52**:570-9
- [7] Ammazalorso F, Graef S, Weber U, *et al.* 2014 Dosimetric consequences of intrafraction prostate motion in scanned ion beam radiotherapy *Radiother Oncol* [in press]
- [8] Ammazalorso F, Jelen U, Engenhardt-Cabillic R, *et al.* 2014 Dosimetric robustness against setup errors in charged particle radiotherapy of the skull base *Radiat Oncol* (submitted)
- [9] Jelen U 2011 Recommendations for organ depending optimized fixation systems *ULICE deliverable D.JRA.5.1*
- [10] The American College of Radiology 2011 *ASTRO Practice guideline for intensity modulated radiation therapy (IMRT)*
- [11] De Ruyscher D, Faivre-Finn C, Nestle U, *et al.* 2010 European Organisation for Research and Treatment of Cancer recommendations for planning and delivery of high-dose, high-precision radiotherapy for lung cancer *J Clin Oncol* **28**:5301-10
- [12] The Royal College of Radiologists, Society and College of Radiographers, Institute of Physics and Engineering in Medicine 2008 *On target: ensuring geometric accuracy in radiotherapy*
- [13] Mahajan A 2013 Pediatric proton therapy in the 4/5 D era in Proceedings to the 52 Annual Meeting for the Particle Therapy Cooperative Group (PTCOG) *Int J Particle Ther* **1**: 79-80
- [14] www.ptcog.ch
- [15] Wroe AJ, Bush DA, Slater JD 2014 Immobilization considerations for proton radiation therapy *Technol Cancer Res Treat* **3**:217-26
- [16] Jelen U, Bubula ME, Ammazalorso F, *et al.* 2013 Dosimetric impact of reduced nozzle-to-isocenter distance in intensity-modulated proton therapy of intracranial tumors in combined proton-carbon fixed-nozzle treatment facilities *Radiat Oncol* **8**:218
- [17] Combs S, Ellerbrock M, Haberer T, *et al.* 2010 Heidelberg Ion Therapy Center (UKL-HD): Initial clinical experience in the first 80 patients *Acta Oncol* **49**:1132-40
- [18] Jensen DA, Winter M, Kuhn SP, *et al.* 2012 Robotic-based carbon ion therapy and patient positioning in 6 degrees of freedom: setup accuracy of two standard immobilization devices used in carbon ion therapy and IMRT *Radiat Oncol* **7**:51
- [19] Bolsi A, Lomax A, Pedroni E, *et al.* 2008 Experiences at the Paul Scherrer Institute with a remote patient positioning procedure for high-throughput proton radiation therapy *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **71**:1581-90
- [20] Wroe AJ, Bush DA, Schulte R, *et al.* 2014 Clinical immobilization techniques for proton therapy *Technol Cancer Res Treat* [Epub ahead of print]
- [21] van Kranen S, van Beek S, Rasch M, *et al.* 2009 Setup uncertainties of anatomical sub-regions in head-and-neck cancer

patients after offline CBCT guidance *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **73**:1566-73

[22] Houweling A, van der Meer S, van der Wal E, *et al.* 2010 Improved immobilization using an individual head support in head-and-neck cancer patients *Radiother Oncol* **96**:100-3

[23] Weber U, Grübling P, Rösch W 2009 A device for immobilization *48 Annual Meeting for the Particle Therapy Cooperative Group (PTCOG)*

[24] van Herk M, Bruce A, Kroes AP, *et al.* 1995 Quantification of organ motion during conformal radiotherapy of the prostate by three dimensional image registration *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **33**: 1311-1320

[25] Griffiths SE, Stanley S, Sydes M, *et al.* 2004 Recommendations on best practice for radiographer set-up of conformal radiotherapy treatment for patients with prostate cancer: experience developed during the MRC RT01 trial (ISRCTN 47772397) *J Radioth Pract* **4**:107-17

[26] Smeenk RJ, Louwe RJ, Langen KM, *et al.* 2012 An endorectal balloon reduces intrafraction prostate motion during radiotherapy *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **83**:661-9

[27] Amos RA, Johnson JL, Kudchadker R, *et al.* 2006 Target dose coverage in the presence of alignment rotation for proton therapy of prostate cancer *45 Annual Meeting for the Particle Therapy Cooperative Group (PTCOG)*

[28] Kagawa K, Murakami M, Hishikawa T, *et al.* 2002 Immobilization and dose-sparing effects of a rectal balloon in conformal proton radiotherapy of the prostate *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **54** (Suppl):184t

[29] Outhwaite J-A, McDowall W R, Marquart L, *et al.* 2013 Training programme impact on thermoplastic immobilization for head and neck radiation therapy *Radiography* **19**:28-34

Appendix A

1. Technical issues

1.1. What kind of immobilization devices (ID) do (will/would) you use?

- homemade
- manufactured: which company/brand?

1.2. Are (will/would they be) they?

- standardized
- customized

1.3. Who is in charge of the preparation of the ID?

- the radiation oncologist
- the physicist
- a dedicated immobilization specialist
- a radiation therapist / technologist ?
- a radiation dosimetrist

1.4. How long does it take to manufacture any ID for any adult patient?

.....

1.5. When does it take place in the treatment process?

- prior to the planning CT
- at the same time as the planning CT

1.6. Do (will/would) you use any of these ID?

- Bite block
- Thermoplastic mesh mask (aquaplast™)and other holders
- Vacuum bags
- Body fix™(hip fix)
- Plastic casting holders
- Stereotactic head frame
- Alpha cradle™fising foam
- Moldcare™
- Any other common ID:

1.7. What kind of material would you recommend?

- carbon fiber
- acrylic
- polyurethane
- other:

2. Physical issues

2.1. Did (will/would) you modelize its attenuation in your TPS?
 yes no (only Hounsfield numbers)

2.2. Did (will/would) you pay attention to its chemical composition?
 yes no

2.3. Is (will/would) the incident ion beam going (go) through the ID mater?
 yes no

2.4. Do (will/would) you take it into account for the dosimetry?
 yes no
 if yes, how?

2.5. Due to the particular interactions taking place into the ID, shall (should) it give rise to any specific radioprotection issue (activation, neutron emission, dose increase to the skin, etc)?
 yes no
 if yes, precise

3. Economical issues

3.1. Did (will/would) you pay attention to its cost?
 yes no

3.2. Could you give an estimation of the ID cost per patient?

4. Accuracy issues

4.1. Did (will/would) you pay attention to its accuracy?
 yes no

4.2. How do (will/would) you check the accuracy of your ID / repositioning?
 daily imaging (X-ray or portal or Cone-Beam)
 weekly imaging (X-ray or portal or Cone-Beam)
 In-situ CT scan
 In-situ PET imaging

4.3. Do (will/would) you use a robotic treatment table?
 yes no

5. Pediatric specificities

5.1. Do (will/would) you use specific ID for children
 yes no

5.2. If yes, which one(s) ?
.....

5.3. Would you recommend beams traversing the anesthesia mask in H&N, CNS or skull base locations?
 yes no

6. Miscellaneous

6.1. Do (will/would) you train the radiation therapist to the proper use of the ID ?
 yes no

6.2. Where do (will/would) you store the ID?
.....

6.3. Do (will/would) you reuse/recycle the ID?
 yes no

7. Synthesis

Rank the properties that must have the mater of which is made the ID
(1: mandatory ⇒ 9: not necessary)

- low attenuation levels
- lightweight
- durable
- cheap
- efficient (less movement permitted)
- reusable
- modifiable during the treatment course
- not claustrophobia/anxiety inducers/open or transparent
- comfortable
- Other:



Project co-funded by the European Commission within the FP7 (2007–2013)
Grant agreement no.: 228436

ULICE

Union of Light Ion Centres in Europe

Project type: Combination of CP & CSA
Integrating Activities / e-Infrastructures / Preparatory
phase
Start date of 1st September 2009 Duration: 48 months
project:

D TNA 11.11 Design and Implementation of Clinical Trial II

WP n° and title:	WP 11 TNA
WP leader:	Jürgen Debus
Author(s):	Guillaume Vogin, Jacques Balosso, Jürgen Debus, Stephanie Combs, Pascal Pommier
Contributor(s):	Guillaume Vogin, Jacques Balosso, Jürgen Debus, Stephanie Combs, Pascal Pommier
Pillar coordinator:	Jürgen Debus
Reporting period:	2nd

ETOILE1: Medical and economical prospective randomized assessment of carbon ions radiotherapy (CIRT) in unresectable or R2-resected sarcomas and cystic adenoid carcinomas.

Because of their physical and biological properties, carbon ions may be well suited in specific situations such as localized, unresectable (or macroscopically incompletely resected) tumors, resistant to low LET radiation (photons and protons) and close to radiosensitive organs at risk.

Some histological subtypes are known for their intrinsic radiation resistance (melanoma, most of sarcomas, chordomas, adenoid cystic carcinomas, glioblastomas...). Some of the most commonly treated primaries (e.g. squamous cell carcinomas, adenocarcinomas) may carry extremely variable radiation sensitivity related to tumor hypoxia and/or intrinsic biological features that are still poorly understood and difficult to identify. However such tumors remain still rare.

ETOILE has been recently commissioned by the French Ministry of Health to 1) "design and build the National Center for CIRT" (opening scheduled in 2016), 2) "recruit a cohort of French patients to be treated in foreign centers and 3) "conduct a medico-economic benchmarking."

After a broad independent review of the literature as performed in the other CIRT centers and in absence of phase III studies, ETOILE classified situations where CIRT may be indicated into two priority groups, depending on current levels of evidence.

In the present study two subsets of inoperable or macroscopically incompletely resected (R2) tumors were selected. Known for their intrinsic radiation resistance, all-locations soft tissue sarcomas and head and neck adenoid cystic carcinomas (ACC) are frequent enough to be assessed in a short-duration binational clinical trial. Chordomas and chondrosarcomas of the skull base are currently being randomized between protons and CIRT at HIT (Heidelberg) and were excluded from ETOILE1 [1-3].

A summary of the literature review is presented in the Annexes [See Annexes 1 and 2] [4-13].

- In salivary glands adenocarcinomas, CIRT gives similar results at 5 years compared to those obtained at 2 years with a combination of neutrons and stereotactic photon radiotherapy (Gammaknife®), with a local control of 80 % at 5 years.
- A local control of 38% at 3 years and 25% at 4 years is reported with state-of-art photon techniques in ACC. The best outcome was reported in a series of 23 patients (93% local control at 5 years) with bi-fractionated accelerated protocols combining photons and protons; however neurological toxicity was significant in almost half of the patients. The first early phase CIRT trial performed at NIRS (Japan) reported a local control rate of 74% at 5 years that was confirmed later by HIT team and a combined treatment. Interestingly the superiority of the association over solely photons was evidenced for the first time.
- PSI (Switzerland) evaluated definitive protons vs. a combination of protons and photons in soft tissue sarcomas relapses, or primaries with R1 or R2 resection. Local control reached 74% at 4 years with an acceptable tolerance. NIRS previously reported a local control of 79% at 5 years on a phase II study involving 331 patients despite a very high tumor volume (mean 500 mL).

The indications explored by ETOILE1 trial have already been evaluated by French health authorities. Neutrontherapy had been validated in 1995 in limb sarcomas and tumors of the salivary glands (inoperable or R2-resected) [14]. Last year High Authority for Health (HAS), ranked CIRT as "potentially more efficient than conventional radiotherapy (salivary glands, ACC) and "potentially equivalent to other innovative photon techniques" (sarcomas) [15].

High LET particles are recommended by other instances for a while [16 -19] and in a recent review of literature published by Prof. Suit [20].

1.3. Medico-economic considerations

Several factors have limited the spread of CIRT. The lack of evidence formally demonstrating and measuring the therapeutic gain provided by CIRT, the very limited processing capacity due to the lack of treatment centers, and the difficulty for these rare tumors to establish a reference treatment to compare with particle therapy may be involved[21]. The first randomized trials performed by HIT and comparing protons and CIRT in different locations is really a major advance. [1-3, 22 and 23]

In the framework of ULICE European network (Union for Light Ion Centers in Europe - FP7), HIT and ETOILE will collaborate in this appraisal to provide a high standard of proof.

In parallel with the medical aspects, it is important to take into account the medico-economics aspects (cost / medical service) of these new technologies that need higher investment and operating costs than "conventional" equipments. The additional cost of initial treatment must be justified by a therapeutic gain for patients in terms of cure rate and / or quality of life. Retrospective studies and health economic simulations show that the overall cost of the therapeutic management of some

cancers could be reduced by CIRT due to "avoided costs": 1) in primary care because of the brevity of treatment (13 sessions on average instead of 30) and 2) reducing the need for secondary care by reducing relapses and toxicities of current therapies [24-26]. Moreover in CIRT as in any new technology, investment and operation costs should decrease with the spreading of the technology [27-28].

The medico-economic study associated with the present clinical evaluation aims to assess and measure the cost-effectiveness of CIRT, compared to the reference treatment.

2. RELEVANCE AND FEASIBILITY

2.1. Relevance

ETOILE1 was requested by health authorities to bring high-level evidence for CIRT, to structure a network and optimize the management of radiotherapy for these rare tumors and to train the future medical team of ETOILE Center.

2.2. Feasibility

Several existing structures will help to realistically achieve the objectives : two national networks dedicated to rare cancers (NETSARC; REFCOR), the solid expertise of the ETOILE members in the field of medical and economic assessment of CIRT, strong European collaborations in the framework of ENLIGHT then ULICE projects, dedicated existing tools such as a prospective epidemiological study (EpiHadron) and POSE observatory that help to recruit patients.

Previous epidemiological studies showed a theoretical potential dedicated recruitment of 300 patients per year [29, 30], among which 250 patients will have to be randomized over the inclusion period of approximately 4 years. Over this period, 125 patients will receive CIRT at HIT starting in 2012.

3. OUTLINE OF THE STUDY

ETOILE1 is a prospective randomized study assessing CIRT vs. state-of-art techniques in non metastatic, unresectable or R2-resected head&neck adenoid cystic carcinomas and all-locations sarcomas.

Two treatment strategies will be compared:

- CIRT experimental arm, in which all or part of the radiation will be delivered by carbon ions at HIT
- A control arm in which patients will be treated in France, by photons or protons, with advanced techniques (IMRT, helical tomotherapy, Modulated Arc Therapy, Stereotactic Body RadioTherapy) suited to each case and according to guidelines established by the investigators.

As a whole, 250 patients will be enrolled and randomized (125 in each arm) over a period of 4 years.

3.1. Identification / screening of patients

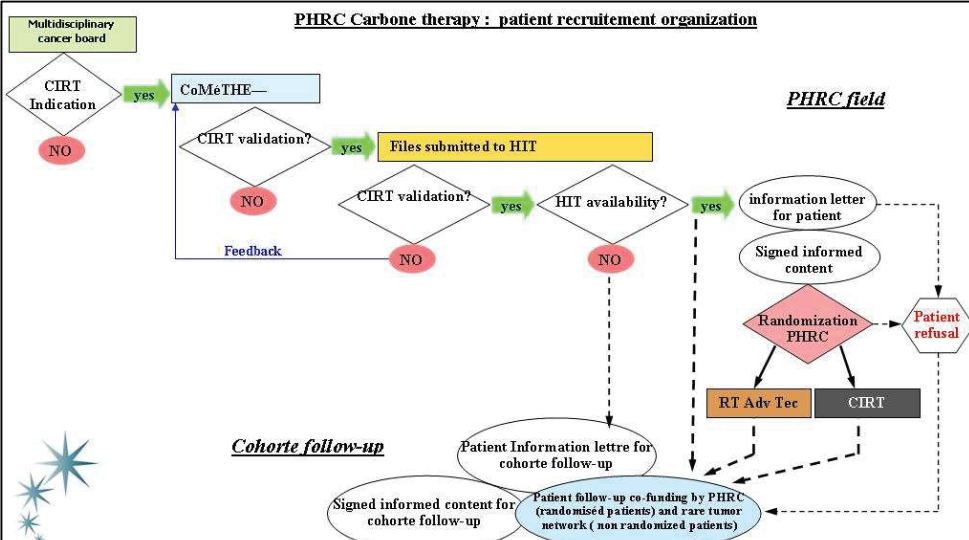
Potentially eligible patients will be identified within local primary tumor boards and / or in NETSARC and REFCOR networks.

After having informed the patient, the dedicated investigator will refer and address the chart with required elements (histology, imaging, operative reports, etc.) to the Coordination Center, where he will be expertized by ETOILE medico-technical committee (CoMÉTHe)

If validated, the patient's case is then submitted by ETOILE to HIT medical team, that may confirm CIRT indication and propose or not to treat the patient at HIT according to facility availability and the post operative delay.

The referral investigator of the patient is informed of the decision by the coordination unit of study in any case:

- Non-eligibility of the patient in this study: if not validated by CoMÉTHe or HIT, or in case of validation but if it is impossible to introduce the patient in the schedule for any reason,
- Eligibility, if validated by CoMÉTHe and HIT and when capacity allows planning the treatment with adequate time delay.

<p>Promotor Hospices Civils de Lyon 3 quai des Célestins 69002 Lyon Contact : Mme Odile GELPI +33 4 72 40 68 52</p>	<p>Coordination team</p> <p>Principal Investigator Pascal Pommier, MD, PhD ; Radiation oncologist Centre Léon Bérard, F-69373 Lyon Cedex 08 +33 4 78 78 51 66 ; pommier@lyon.fnclcc.fr</p> <p>Study manager Stéphanie Patin, MSc ; GCS-ETOILE 60 Av Rockefeller ; F-69008 Lyon +33 4 72 78 89 24 ; stephanie.patin@centre-etoile.org</p>
<p>OBJECTIVES</p>	<p>Main Objective The main objective is to demonstrate an improvement by 20% of disease-free survival (70 in CIRT vs. 50% in the reference arm) in patients included within CIRT arm, over the best methods of photon- or proton radiotherapy available in France.</p> <p>Secondary Objectives Medical evaluation, demonstrating a therapeutic gain in terms of efficiency (overall survival, specific survival and local control), acute and late tolerance, and quality of life. Economic evaluation (ancillary study) assessing and comparing the different therapeutic strategies in terms of cost and cost-effectiveness ratio.</p>
<p>SCHEME</p>	<p>Phase III, multicentre and randomized study</p> <p>Eligible patients will be identified during primary local tumor boards (RCP) by nearly 30 collaborating French teams. The National Medico-technical Committee (CoMéTHE) will then validate the indications for CIRT on the basis of European (HIT) guidelines. The committee is coordinated by the Principal Investigator and includes French and European physicists and medical experts. After providing the approval of the patient and the availability of the CIRT center, randomization will be performed between CIRT and "standard" treatments.</p>  <p>The flowchart, titled "PHRC Carbone therapy : patient recrutement organization", details the patient recruitment process. It starts with a "Multidisciplinary cancer board" leading to a "CIRT Indication" decision. If "NO", it loops back to the board. If "yes", it goes to "CoMéTHE—". From "CoMéTHE—", a "CIRT validation?" decision is made. If "NO", it leads to "Feedback" and loops back to "CIRT Indication". If "yes", "Files submitted to HIT". Another "CIRT validation?" decision follows. If "NO", it loops back to "CIRT validation?". If "yes", it checks "HIT availability?". If "NO", it loops back to "CIRT validation?". If "yes", it proceeds to "information letter for patient", then "Signed informed content", and a "Randomization PHRC" decision. From "Randomization PHRC", patients are assigned to either "RT Adv Tec" or "CIRT". A "Patient refusal" path also branches from the "Randomization PHRC" decision. Both treatment arms lead to "Cohorte follow-up", which includes "Patient Information lettre for cohorte follow-up" and "Signed informed content for cohorte follow-up". A note indicates "Patient follow-up co-funding by PHRC (randomised patients) and rare tumor network (non randomized patients)".</p>
<p>INTERVENTIO N</p>	<p>CIRT (experimental arm) The therapeutic schemes will be those applied at the CIRT centre in Heidelberg (HIT), with two modalities according to the type of cancer:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Head and Neck ACC: Association of photons and CIRT. Carbon ions: 24 Gy_{E(RBE)} in 8 fractions to the gross target volume (3 Gy_{E(RBE)} /fraction, 5 fractions/week). CIRT will be performed in Germany at HIT Photon-IMRT: 50 Gy to the clinical target volume (2 Gy/fraction, 5 fractions/week). The photon part will be conducted in the local French center; • Sarcomas: Definitive CIRT 60 Gy_{E(RBE)} in 20 fractions and 4 weeks (3Gy_{E(RBE)} /fraction, 5 fractions/week). <p>Control arm</p>

	<p>Conformal radiotherapy with photon and/or proton beams. Photon RT may be performed in two ways:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) conformal intensity modulated radiotherapy (IMRT) with conventional or helical linear accelerator. 2) stereotactic RT (SRT), with conventional linear accelerator or dedicated linac (CyberKnife®). <p>Protontherapy will be performed at the Institut Curie - Centre de Protonthérapie d'Orsay (ICPO) according to the protocols in use.</p> <p><u>Establishment of guidelines</u> As part of the PHRC and in partnership with the rare cancers networks accredited by INCa (NETSARC and REFCOR), guidelines will be set up to define every situation (ACC; soft tissue sarcoma, osteosarcoma and chordoma of the spine, the sacrum or extra-axial). Treatment options allowed (IMRT, proton therapy or SRT), and rules for treatment planning (prescribed dose; fractionation scheme; constraints for target volumes and organs at risk) will be collected.</p> <p><u>Quality control</u> Quality control of RT will be performed (definition of target volumes; dosimetric data: index of quality, dose-volume histograms for target volumes and organs at risk). Depending on the degree of heterogeneity observed in practice at the beginning of the study, this control may be partly centralized and become preliminary to treatment of the patients.</p>		
EVALUATION CRITERIA	<p><u>Primary endpoint</u> The primary endpoint of the study is the disease-free survival at 5 years after completion of radiotherapy. Disease-free survival is defined as the time elapsed between the date of randomization until the date of first evidence of a documented relapse or until the date of death from any cause or until to the date of latest news.</p> <p><u>Secondary endpoints</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Overall survival, that is defined as the time elapsed between the date of randomization and the patient's death whatever the cause or the date of latest news. • Safety profile: that will be evaluated by the type, frequency and severity of toxicities presented by patients, and rated according to CTCAE V4.0. scale • Quality of life will be evaluated at baseline, at the end of radiotherapy, then 2 months, 6 months, then 2 and 5 years using the QLQ-C30 of EORTC. 		
NUMBER OF PATIENTS	<p>125 patients per group (250 total) are necessary. The aim is to demonstrate a gain of 20% of DFS_{5y} with CIRT (70% in the CIRT arm vs. 50% in the control arm), that is equivalent to an HR = 0.515). 92 events at the time of analysis have to be planned along a period of recruitment of 4 years and followed up of 7 years for the first enrolled patients. (Bilateral test with alpha = 5% and a power of 90%). <i>The number of events will be monitored by an external committee to make possible an adjustment of the number of patients to recruit.</i></p>		
TRIAL DURATION	<p>First inclusions: 2nd trimester 2012 Last inclusions: 3rd trimester 2015 Duration of study follow-up: 5 years after the end of radiotherapy Analysis Report (PHRC): 1st trimester 2017</p>		
PATIENTS	<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="vertical-align: top; width: 50%;"> <p><u>Inclusion criteria:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Age ≥ 18 years • Absence of severe comorbidities, life expectancy exceeding 10 years • Cancer unresectable or resection macroscopically incomplete (R2) • Cancer considered as radioresistant: <ul style="list-style-type: none"> - head and neck adenoid cystic carcinoma (ACC) - sarcomas including soft tissue sarcomas, osteosarcomas (all sites and pathologies, except skull base chondrosarcomas) and chordomas of the axial skeleton and pelvis (base of skull excluded) </td> <td style="vertical-align: top; width: 50%;"> <p><u>Non-inclusion criteria:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Surgical excision grossly or microscopically complete (R0 or R1) • History of radiotherapy in the treated site • Metastatic disease • Previous or concomitant presence of another cancer except in situ carcinoma of the cervix or basal cell skin carcinoma treated in a curative intent, or any other cancer curatively treated and without evidence of recurrence for at least 5 years • Pregnancy or absence of reliable method of contraception during treatment in women of childbearing age. • Patient unfit for follow-up </td> </tr> </table>	<p><u>Inclusion criteria:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Age ≥ 18 years • Absence of severe comorbidities, life expectancy exceeding 10 years • Cancer unresectable or resection macroscopically incomplete (R2) • Cancer considered as radioresistant: <ul style="list-style-type: none"> - head and neck adenoid cystic carcinoma (ACC) - sarcomas including soft tissue sarcomas, osteosarcomas (all sites and pathologies, except skull base chondrosarcomas) and chordomas of the axial skeleton and pelvis (base of skull excluded) 	<p><u>Non-inclusion criteria:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Surgical excision grossly or microscopically complete (R0 or R1) • History of radiotherapy in the treated site • Metastatic disease • Previous or concomitant presence of another cancer except in situ carcinoma of the cervix or basal cell skin carcinoma treated in a curative intent, or any other cancer curatively treated and without evidence of recurrence for at least 5 years • Pregnancy or absence of reliable method of contraception during treatment in women of childbearing age. • Patient unfit for follow-up
<p><u>Inclusion criteria:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Age ≥ 18 years • Absence of severe comorbidities, life expectancy exceeding 10 years • Cancer unresectable or resection macroscopically incomplete (R2) • Cancer considered as radioresistant: <ul style="list-style-type: none"> - head and neck adenoid cystic carcinoma (ACC) - sarcomas including soft tissue sarcomas, osteosarcomas (all sites and pathologies, except skull base chondrosarcomas) and chordomas of the axial skeleton and pelvis (base of skull excluded) 	<p><u>Non-inclusion criteria:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Surgical excision grossly or microscopically complete (R0 or R1) • History of radiotherapy in the treated site • Metastatic disease • Previous or concomitant presence of another cancer except in situ carcinoma of the cervix or basal cell skin carcinoma treated in a curative intent, or any other cancer curatively treated and without evidence of recurrence for at least 5 years • Pregnancy or absence of reliable method of contraception during treatment in women of childbearing age. • Patient unfit for follow-up 		

	<ul style="list-style-type: none"> • Performance Status (PS) ECOG ≤ 2 • A reliable contraceptive method is necessary in non-pregnant women of childbearing age • Patient affiliated to health insurance • Informed consent signed <p><u>Randomization criteria</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Validation of CIRT by ETOILE medico-technical committee (CoMÉTHe) and HIT medical team • Ability to receive CIRT in an adequate delay • Informed consent signed 	
EXPECTED RESULTS	We expect to enroll respectively 30, 50, 85 and 85 patients/year during the 4 years of inclusion and demonstrate a gain of 20% in DFS _{5y} with CIRT. The associated economic study will compare the long-term cost-effectiveness of both therapies and will individualize the "induced costs" and "avoided costs" related to CIRT.	
ASSOCIATED TEAMS	30 French medical departments + HIT, Pr Jürgen Debus Department of Radiation Oncology, University Hospital Heidelberg Neuenheimer Feld 400 ; D-69120 Heidelberg Juergen.Debus@med.uni-heidelberg.de; Tél : +49 62 21 56 82 02	



Project co-funded by the European Commission within the FP7 (2007–2013)
Grant agreement no.: 228436

ULICE

Union of Light Ion Centres in Europe

Project type: Combination of CP & CSA
Integrating Activities / e-Infrastructures / Preparatory phase
Start date of project: 1st September 2009 Duration: 48 months

D TNA 11.8 Dedicated Space on the ULICE web site for clinical access

WP n° and title:	WP 11 TNA
WP leader:	Jürgen Debus
Author(s):	Jürgen Debus, Thomas Haberer, Stephanie Combs, Piero Fossati, Marco Kregli
Contributor(s):	Jürgen Debus, Stephanie Combs, Jacques Balosso, Guillaume Vogin, Piero Fossati, Marco Kregli
Pillar coordinator:	Jürgen Debus
Reporting period:	2nd

On the ULICE web page, dedicated pages for access have been generated.

Within the TA activities, patients from European countries will be treated at the operational facilities. Furthermore, referring radiation oncologists and/or senior researchers will have the opportunity to accompany their patients to the treating facilities and participate in patient treatment planning and the treatment itself. In addition, they will profit from a comprehensive teaching program including target volume definition, treatment planning and beam delivery. Moreover beam time will be made available for radiobiology and physics research for external researchers who do not have an available ion beam in their laboratory.

In this framework, researchers from any eligible country can apply to participate in research activities and propose and implement experimental projects in the clinical, radiobiological and physical fields at the [University Hospital of Heidelberg \(UKL-HD\)](#) in Germany and the [Centro Nazionale Adroterapia Oncologica \(CNAO\)](#) in Italy. Eligible external users can apply for transnational access and for successful applicants this will be provided free of charge, via European Union Transnational Access funding.

Two types of applications are allowed:

- Pre-clinical (Physical and Radiobiological) Research Activity
- Clinical Research Activity

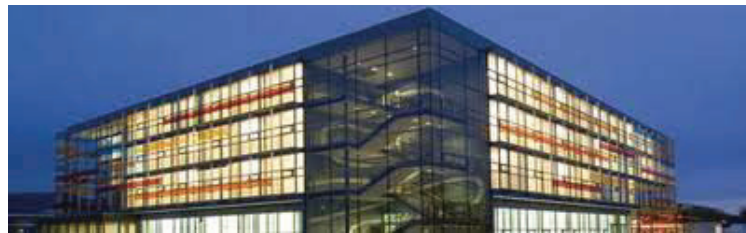


Transnational Access at UKL-HD



At the Department of Radiation Oncology at the University Hospital of Heidelberg (UKL-HD), carbon ion and proton radiotherapy will be offered at the Heidelberg Ion Therapy Centre (HIT). The HIT-facility offers three treatment rooms, two horizontal treatment rooms and one gantry, for proton as well as carbon ion radiotherapy. The gantry is the world's first carbon ion gantry. In addition HIT offers infrastructure for research and development in the field of ion therapy. Labs for medical physics, ion beam technology and radiobiology as well as an experimental cave equipped with a state of the art beam scanning system are part of HIT. In the facility, treatment of over 1300 patients per year with particle therapy will be possible. In Germany, HIT@UKL-HD is the first centre to offer proton as well as carbon ion treatment and is treating patients since autumn 2009. The staff has extensive experience in all conventional and modern radiation therapy techniques and has substantial experience with carbon ion radiotherapy. Ongoing research at UKL-HD is in tight connection with the Department of Radiation Oncology at the University Hospital of Heidelberg and the Departments of Radiation Oncology and Medical Physics at the German Cancer Research Centre (DKFZ).

From ion beam technology and medical physics, optimization of ion treatment from beam application, treatment planning and delivery is currently under evaluation. Transfer of novel physical applications into clinical practice in a timely fashion is a main goal. Radiation Biology offers high-end project on a cellular and molecular basis, with special focus on radiobiological effects of high-LET beams as well as angiogenesis and molecular responses to radiation therapy. In conjunction with the University Hospitals of Heidelberg and the National Centre to Tumour Diseases (Nationales Centrum für Tumorerkrankungen, NCT) innovative clinical concepts and studies of all phases are being conducted and will have a main focus on the evaluation of carbon ion radiotherapy in a number of tumour entities. With the UKL-HD facility, the unique possibility to perform physical, biological and clinical studies will open new horizons. For clinical evaluations, the facility offers the possibility for large randomized studies on protons, carbon ions and photons alike. For preclinical research HIT offers dedicated infrastructure. Currently, HIT offers proton, carbon and oxygen beams.



Within the ULICE TNA Pillar, beam-time at HIT for radiobiological / physics / clinical research projects proposed in the JRA pillar will be available for up to 131 hours. Within JRA, a number of research projects developed to improve and expand carbon ion facilities have been created, some of which require particle beam time at a running facility. Within TNA, beam time for research dedicated to improvement of infrastructures and methodology are distributed by a review committee consisting of experts in the fields.

At HIT a dedicated application form has been generated and can be used to apply for beamtime.

Research projects allotted with beam time may be projects that have been included in the JRA-pillar, however, which do not receive beam-time through the project financing within JRA; they may also be research project by groups not initially involved in the proposed ULICE framework, which are allocated beam time for their research by the independent review committee. Researchers must define their projects and submit them to the review committee for ranking and approval

If you are [eligible](#) to apply for Transnational Access, you can download and fill in the Transnational Access application form. Completed forms should be submitted to the ULICE access office: ULICE-access@cern.ch.

[Download the application form here](#) 

There are no submission deadlines.

Selection procedure

Incoming proposals will be examined by the ULICE access office for formal compliance with the [EU rules](#), and then forwarded to a [multicentre scientific review committee](#). The committee meets three times per year to review proposals.

The review procedure will be in two steps: first a go /no-go phase intended to identify proposal that cannot be realized technically. Then a ranking phase in which a score will be assigned to each acceptable proposal and in which the most suitable facility will be selected. The proposal with highest score will be accepted according to foreseen beam time availability. All researchers can at least participate as observers. More direct involvement in patient care will be possible only depending on the researcher status regarding German/Italian laws and rules on medical licences.

At UKL-HD/CNAO the internal review panel will verify the practical feasibility of accepted proposals, and in exceptional cases can reject proposals approved by the scientific committee providing adequate justification. The duration of each project will depend on its specific characteristics. For each project, a reference member of will be identified to help the external researchers and support them in their technical and scientific needs. At the end of the project a report will be produced by the external researcher to summarize the performed activities and the obtained results.

Criteria for application for pre-clinical research will be: expertise in the field of the proposed research with previous successful work on the proposed topic, high priority of the results for further improvements of currently running and future facilities.

Proposals for pre-clinical research will be evaluated with a score ranging from 1 to 5 with the following criteria:

- Clinical/biological/technical relevance
- Qualification of the researcher (previous work, expertise)
- Feasibility of the proposed research
- Potential to improve existing facilities
- Impact on hadrontherapy-related issues

Proposals will be ranked and a minimum of 15 points are required to be selected.

Criteria for application for access to clinical research activities will be: expertise in the field of clinical research in radiotherapy and oncology, potential impact on the future patterns of patient referral and/or of new facilities development.

Proposals for clinical trials must fulfill the following criteria:

- Medical licence valid in Germany, Board Certification for Radiation Oncology valid in Germany, Board Certification in Radiation Protection valid in Germany, to treat patients
- *Clinical study protocol* adhering to the internal guidelines at UKL-HD/CNAO
- Positive vote of the *ethics committee of the University Hospital of Heidelberg/CNAO*

- Positive vote by the *Bundesamt für Strahlenschutz (BfS)/Ministry of Public Health*

Proposals will be rated on a score of 1-5 for the following criteria:

- Previous experience in clinical research
- Practical ability to participate in the clinical activity (language skills and valid license to practice medical activities in Germany/Italy)
- Potential impact on patient referral
- Potential to improve existing or new facilities
- Proposals will be ranked and a minimum of 15 scoring points are required to be chosen.

Proposals (3 pages at maximum) should give solid information about preparatory work, reference projects, goal of the experiment and relevance for the field.

The review committee will evaluate submitted proposals both for researchers willing to have access to the clinical activity and participating in the ongoing trials and for pre-clinical research requiring beam-time and it will distribute the proposals to the running institutions depending on beam time capacity.

The applicants shall be formally informed of the decision by the ULICE access office. If the application is successful the researcher will be advised about the further procedure to follow.

Transnational Access at CNAO  fondazione CNAO

CNAO is an Italian facility whose mission is to provide hadron-therapy treatments (both proton and carbon ion scanned beams) and to perform research in the related fields.

The CNAO synchrotron is able to accelerate proton and carbon ions in the energy range of 60-250 MeV and 120-400 MeV/u, respectively, with a beam penetration depth approximately ranging from 3 g/cm² to 27 g/cm² and steps of 0.1 g/cm². Dose is delivered with active raster scanning, GSI-like. Different spot sizes will be available, with a radial size adjustable from 4 mm to 10 mm (FWHM), in steps of 1 mm. The maximum available field size is 20 x 20 cm².

Up to now, one of the three treatment rooms, equipped with a horizontal fixed beam line, is available for experiments with proton beams in the range of 120-170 MeV.

Moreover, the facility is equipped with one CT scanner, one PET/CT scanner and one 3-T MRI scanner, mainly dedicated to treatment simulation and planning, as well as in-treatment response evaluation and follow-up. Concerning patient positioning, specially designed systems, including both couches and chairs, can be docked to a state of the art, 6 degrees of freedom device. In-room imaging for patient set-up verification can be performed with stereoscopic x-ray kV images of diagnostic quality. Additionally, an optoelectronic system with markers detection and surface detection capability will be implemented. The CNAO centre aims to a high patient through-put. Indeed, the facility design has specifically

addressed this issue and dedicated positioning rooms (Computer Assisted Positioning in Hadron-therapy, CAPH rooms) have been built, adjacent to the treatment rooms. Patients will be positioned on the couch (or on the chair) outside the treatment room, and will be carried in the treatment room on a trolley equipped for docking with the positioning device, thus realizing a time optimization through a pipeline approach.

A dosimetry laboratory has been established by the CNAO Medical Physics Unit and includes the most relevant instrumentation (water and solid phantoms, radiation detectors, like as different types of ionization chambers and radiochromic films, multi-channel electrometers, etc.) for physical characterization of high-energy particle scanned beams, as well as for Quality Assurance.

A radiobiology laboratory has also been equipped for cell and molecular biology studies.



Description of Work

1. Preclinical research. CNAO services and equipments, necessary for the user activity, including the dosimetry and radiobiology laboratories, are available to fulfill the selected project objectives. During the development of the project, the user will be supported by CNAO personnel for technical, scientific and practical aspects.

2. Clinical research. External users participate in running clinical trials that can be explained by internal clinicians. External users will participate in running clinical trials. The design of ongoing and planned clinical trials will be described in the dedicated section both on the ULICE website and CNAO website, to provide needed information for external users access.

For external users, an application form can be downloaded and filled in as follows:

Research projects allotted with beam time may be projects that have been included in the JRA-pillar, however, which do not receive beam-time through the project financing within JRA; they may also be research project by groups not initially involved in the proposed ULICE framework, which are allocated beam time for their research by the independent review committee. Researchers must define their projects and submit them to the review committee for ranking and approval

If you are [eligible](#) to apply for Transnational Access, you can download and fill in the Transnational Access application form. Completed forms should be submitted to the ULICE access office: ULICE-access@cern.ch.

[Download the application form here](#) 

There are no submission deadlines.

Selection procedure

Incoming proposals will be examined by the ULICE access office for formal compliance with the [EU rules](#), and then forwarded to a [multicentre scientific review committee](#). The committee meets three times per year to review proposals.

The review procedure will be in two steps: first a go /no-go phase intended to identify proposal that cannot be realized technically. Then a ranking phase in which a score will be assigned to each acceptable proposal and in which the most suitable facility will be selected. The proposal with highest score will be accepted according to foreseen beam time availability. All researchers can at least participate as observers. More direct involvement in patient care will be possible only depending on the researcher status regarding German/Italian laws and rules on medical licences.

At UKL-HD/CNAO the internal review panel will verify the practical feasibility of accepted proposals, and in exceptional cases can reject proposals approved by the scientific committee providing adequate justification. The duration of each project will depend on its specific characteristics. For each project, a reference member of will be identified to help the external researchers and support them in their technical and scientific needs. At the end of the project a report will be produced by the external researcher to summarize the performed activities and the obtained results.

Criteria for application for pre-clinical research will be: expertise in the field of the proposed research with previous successful work on the proposed topic, high priority of the results for further improvements of currently running and future facilities.

Proposals for pre-clinical research will be evaluated with a score ranging from 1 to 5 with the following criteria:

- Clinical/biological/technical relevance
- Qualification of the researcher (previous work, expertise)
- Feasibility of the proposed research
- Potential to improve existing facilities
- Impact on hadrontherapy-related issues

Proposals will be ranked and a minimum of 15 points are required to be selected.

Criteria for application for access to clinical research activities will be: expertise in the field of clinical research in radiotherapy and oncology, potential impact on the future patterns of patient referral and/or of new facilities development.

Proposals for clinical trials must fulfill the following criteria:

- *German/Italian medical licence* to treat patient
- *Clinical study protocol* adhering to the internal guidelines at UKL-HD/CNAO
- Positive vote of the *ethics committee of the University Hospital of Heidelberg/CNAO*
- Positive vote by the *Bundesamt für Strahlenschutz (BfS)/Ministry of Public Health*

Proposals will be rated on a score of 1-5 for the following criteria:

- Previous experience in clinical research
- Practical ability to participate in the clinical activity (language skills and valid license to practice medical activities in Germany/Italy)
- Potential impact on patient referral
- Potential to improve existing or new facilities
- Proposals will be ranked and a minimum of 15 scoring points are required to be chosen.

Proposals (3 pages at maximum) should give solid information about preparatory work, reference projects, goal of the experiment and relevance for the field.

The review committee will evaluate submitted proposals both for researchers willing to have access to the clinical activity and participating in the ongoing trials and for pre-clinical research requiring beam-time and it will distribute the proposals to the running institutions depending on beam time capacity.

The applicants shall be formally informed of the decision by the ULICE access office. If the application is successful the researcher will be advised about the further procedure to follow.

In conclusion, access has been offered to the ULICE community and now be allotted to research proposals.

Procédures

Pour toute demande d'expertise de radiosensibilité individuelle, contacter le Dr VOGIN (poste 4031, g.vogin@nancy.unicancer.fr) pour organisation d'une consultation spécialisée

L'acte de biopsie

→ de préférence à la face interne du bras, au tiers supérieur, entre le pli du coude et le creux de l'aisselle

→ dans des conditions de stérilité strictes. La peau doit être nettoyée à la chlorhexidine ou l'alcool, à l'exclusion de tout autre antiseptique.

→ une anesthésie locale à la pommade EMLA est souhaitable ; elle est très efficace

→ La biopsie s'effectue de préférence à l'aide d'un dermatome (ou « punch », 2 mm),

Conditionnement de la biopsie

- Immédiatement après le prélèvement, le fragment biopsique est placé dans un tube ou poudrier stérile (flacon ECBU à bouchon rouge) dans du milieu de culture (HAM, RPMI ou DMEM) disponible sur demande anticipée auprès du laboratoire de recherche du Dr Bolotine, à température ambiante ; transporté dès que possible dans des conditions assurant la protection contre les chocs mécaniques et thermiques (protection par plastique à bulles et emballage résistant) après acheminement à l'économat.

L'expédition doit être immédiate et permettre la livraison du prélèvement au Centre de Biotechnologie Cellulaire dans un délai maximal de **48 heures** dans les conditions de transport de matériel biologique. Le transport s'effectue à température ambiante.

- contacter les équipes lyonnaises au moins 1 semaine à l'avance pour convenir d'une date de réception.

- S'arranger pour organiser l'envoi au moins avant le jeudi de la semaine pour éviter tout problème de réception (prévoir 48h au grand maximum pour le trajet du colis).

- Placer le flacon dans un colis de type "transport de matériel biologique" (selon réglementation) avec les éléments spécifiés dans le tableau suivant

- Sceller le carton et apposer le bordereau autocollant de retour pré-rempli si fourni.

- Transmettre le paquet au vague-mestre ou à la personne mandatée par chronomédical ou autre transporteur spécial si enlèvement sur demande.

- Adresser à l'adresse EXACTE suivante :

	colis
contenu	<ul style="list-style-type: none">échantillon cutanéfiche de liaison
destinataire	Dr Isabelle ROUVET / Clémence ESCOFFIER Centre de Biotechnologie Cellulaire Centre de Biologie Est -GHE 59, Boulevard Pinel 69500 BRON Tél 04 72 12 97 01 Tél 04 72 12 97 02

IMPORTANT : Nous prévenir immédiatement après que la biopsie a été faite et envoyée en laissant un message à :

nicolas.foray@inserm.fr, melanie.ferlazzo@inserm.fr, isabelle.rouvet@chu-lyon.fr

ET florence.ferrand@chu-lyon.fr

Lettre d'information au patient

Madame, Mademoiselle, Monsieur

L'équipe médicale en charge de votre santé ou de celle de votre enfant a estimé qu'un traitement par **radiothérapie** (RT) était nécessaire. Environ 200 000 patients dont 700 enfants sont traités par RT. Tout être vivant a une certaine capacité à réparer plus ou moins bien les dommages causés par les radiations ionisantes au niveau de ses cellules. Des **séquelles** à plus ou moins long terme peuvent être observées **chez moins de 10% des patients sans possibilité de les prévenir** pour le moment. Notre équipe a mis au point un **test** permettant d'expliquer pourquoi certains adultes présentent des réactions inhabituelles aux rayons.

Il est donc possible de tester au laboratoire comment vos cellules (ou celles de votre enfant) sont capables de **réparer** ces dommages après une irradiation effectuée in vitro. Pour cela, il nous faut réaliser un **prélèvement d'une très petite quantité de cellules de peau** (biopsie cutanée) **et/ou de sang** pour les étudier au laboratoire.

Une **biopsie de peau** est un acte sans danger, réalisé sous anesthésie et ne laissant en général pas de cicatrice visible. Le risque d'infection locale et de saignement est faible et facilement contrôlé par et des mesures locales simples. Enfin, il est possible de constater une réaction allergique locale et banale au pansement adhésif.

Les prélèvements de peau seront envoyés au **laboratoire de biotechnologie cellulaire des Hospices Civils de Lyon** puis transmis au **Groupe de Radiobiologie CRU 1052 de l'INSERM** où ils seront cultivés puis irradiés dans un appareil de RT. On étudiera ensuite la manière dont les cellules réparent les dommages causés dans leur ADN. Les prélèvements de sang sont à envoyer au **Groupe de Radiobiologie CRU 1052 de l'INSERM**.

Les résultats seront transmis à votre médecin à compter de la 6ème semaine après le prélèvement.

Afin de faire progresser la connaissance, les résultats de cette étude associés à ceux d'autres malades feront l'objet d'analyses comparatives et seront publiés dans des revues scientifiques spécialisées sous forme totalement **anonyme** concernant les personnes à l'origine des prélèvements. Votre participation (ou celle de votre enfant) à cette étude ne peut être que **volontaire**. Aussi, nous vous demandons, si vous y consentez, de signer le formulaire joint à ce document d'information. Vous pouvez refuser ou, en cas d'acceptation, retirer votre consentement à tout moment sans avoir à expliquer votre choix. Votre refus comme votre retrait ultérieur n'auront pas de conséquence dans vos relations avec votre médecin ou celui de votre enfant.

Pour les questions d'ordre médical :

Dr Guillaume VOGIN : guillaumevogin@gmail.com;

Pour les questions d'ordre scientifique :

Nicolas FORAY : nicolas.foray@inserm.fr;

Consentement éclairé

Je soussigné (e) M, Mme, Mlle
Certifie avoir été informé(e) par le Docteur des
objectifs et des désagréments pouvant résulter du prélèvement d'une biopsie de peau et/ou
d'un échantillon sanguin pour l'étude des capacités de réparation de mes cellules (des
cellules de mon enfant) face aux dommages causés par une irradiation.
Je déclare en outre avoir reçu la lettre d'information concernant cette étude.
J'accepte que les données me concernant (moi ou mon enfant) soient traitées anonymement
sur un fichier informatique, en conformité avec les règles en vigueur émises par la
Commission Nationale Informatique et Liberté (CNIL).

Je donne mon accord pour la réalisation du (ou des) prélèvements et des techniques
d'analyses biologiques y compris génétiques, qui sont prévues dans le cadre de l'étude.

Ce prélèvement et ses dérivés seront conservés sauf contrordre de ma part

Je donne mon accord pour que ce prélèvement et/ou ses dérivés, non utilisés pour cette
étude et anonymisés, puissent être mis à la disposition de la communauté scientifique à des fins
de recherche biomédicale à la fin de l'étude. Je serai informé des recherches envisagées.

Je m'oppose à ce que ce prélèvement et/ou ses dérivés, non utilisés pour cette étude et
anonymisés, puissent être mis à la disposition de la communauté scientifique à des fins de
recherche biomédicale à la fin de l'étude.

Je suis libre d'accepter ou de refuser cette étude en retirant mon consentement à tout
moment sans avoir à me justifier, ni à engager ma responsabilité. Ceci n'entraînera en
aucune manière des conséquences dans la qualité des soins qui me seront donnés (à moi
ou mon enfant), ni dans les relations avec mon médecin (ou celui de mon enfant).

Fait à, le

Signature du patient
(Ou du détenteur de l'autorité parentale)

Nom et signature du médecin

Questionnaire médical (2/2)

• Complications post op ? Non Oui
Si oui :

5 Si indiquée: RT et Dosimétrie :

Nom du physicien médical à contacter en cas de besoin :

Dose prescrite: Gy

Dose par fraction : Gy

Etalement : j

Particule(s):

Energie : MeV

Technique :

Premier jour de radiothérapie (JJ/MM/AAAA) :

Volume du PTV : mL

Dose moyenne au PTV : Gy

Dosimétrie revue : Non Oui si oui, erreur dosimétrique significative ?

Type d'accélérateur :

6 Si indiquée: Réaction du patient pendant ou suite à la radiothérapie, et ayant motivé le test :

Date de survenue de l'effet : (JJ/MM/AAAA) :

Réaction pendant le traitement : Non Oui

Réaction après le traitement : Non Oui

Localisation de la réaction :

Dose reçue à la déclaration : Gy

Grade CTCAE :

Traitement apporté :

Conduite à tenir concernant la poursuite de la RT:

Commentaires :

EVIRaS

N°ID RCB : 2012-A00318-35

Etude de la Variabilité inter et intra Individuelle de la Radiosensibilité des tissus Sains.

Version n°2 – 26.09.12

INVESTIGATEUR COORDONNATEUR CAV	Dr Guillaume VOGIN Radiothérapeute Centre Alexis Vautrin 6 avenue de Bourgogne CS 30519 54519 Vandœuvre-les-Nancy Tél : 03 83 59 84 27- Fax : 03 83 59 83 91 Email : g.vogin@nancy.unicancer.fr ET CHR Metz-Thionville, hôpital de Mercy; 1, allée du Château - CS 45001 – 57 085 Metz Cedex 03 Email : g.vogin@chr-metz-thionville.fr
INVESTIGATEUR CO-COORDONNATEUR CAV	Pr Frédéric MARCHAL Chirurgien Centre Alexis Vautrin 6 avenue de Bourgogne CS 30519 54519 Vandœuvre-les-Nancy Tél : 03 83 59 84 51- Fax : 03 83 59 85 47 Email : f.marchal@nancy.unicancer.fr
PROMOTEUR	Centre Alexis Vautrin - CAV 6, avenue de bourgogne CS 30519 54519 Vandœuvre-lès-Nancy, Cedex Tél : 03 83 59 84 00 - Fax : 03 83 44 60 71 Directeur général : Pr Thierry CONROY Email : t.conroy@nancy.unicancer.fr



CONFIDENTIEL

Protocole : EVIRaS
RCB : 2012-A00318-35

AUTORISATION D'ESSAI CLINIQUE DU PROTOCOLE EVIRaS

Etude de la Variabilité inter et intra Individuelle de la Radiosensibilité des tissus Sains.

AUTORISATION D'ESSAI CLINIQUE	
COMITE DE PROTECTION DES PERSONNES	Date d'avis : 5.06.12
NOM DU CPP : CPP EST III	Réf. CPP : 12.04.01

COMITE DE REDACTION	Dr Guillaume VOGIN, Pr Frédéric MARCHAL, Dr Sophie RENARD-OLDRINI, Dr Emmanuel DESANDES, Dr Véronique GILLON, Laurinda FERNANDES
Docteur Desandes METHODOLOGISTE - BIostatisticien	Centre Alexis Vautrin Département d'Information Hospitalière 6 avenue de Bourgogne CS 30519 - 54519 Vandoeuvre-les-Nancy e-mail : e.desandes@nancy.unicancer.fr Tél : 03 83 59 84 70 – Fax : 03 83 59 84 15

COORDONNEES UTILES	
Dr Guillaume VOGIN Investigateur Coordonnateur	Docteur Guillaume VOGIN Département Radiothérapie - Centre Alexis Vautrin 6, avenue de Bourgogne CS 30519 - 54519 Vandoeuvre-lès-Nancy cedex Tel : 03.83.59.84.27 - Fax : 03.83.59.83.91 e-mail : g.vogin@nancy.unicancer.fr
Dr Véronique GILLON RESPONSABLE RECHERCHE CLINIQUE	Docteur Véronique GILLON Centre Alexis Vautrin 6, avenue de Bourgogne CS 30519 - 54519 Vandoeuvre-lès-Nancy cedex Tel : 03.83.59.86.08 - Fax : 03.83.59.83.59 e-mail : v.gillon@nancy.unicancer.fr
Dr Christophe GOETZ RESPONSABLE RECHERCHE CLINIQUE	Plateforme d'Appui à la Recherche Clinique (PARC) CHR Metz-Thionville, hôpital de Mercy; 1, allée du Château - CS 45001 – 57 085 Metz Cedex 03 e-mail : c.goetz@chr-metz-thionville.fr
Laurinda FERNANDES Chef de Projet	Laurinda FERNANDES Centre Alexis Vautrin 6, avenue de Bourgogne CS 30519 - 54519 Vandoeuvre-lès-Nancy cedex Tel : 03.83.59.84.87 - Fax : 03.83.59.83.59 e-mail : l.fernandes@nancy.unicancer.fr
Inclusion	<i>Les inclusions sont assurées de 8h30 à 17h30 au numéro de fax :</i> Fax : 03 83 59 83 59



CONFIDENTIEL

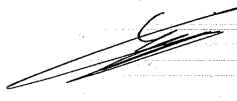
Protocole : EVIRaS
RCB : 2012-A00318-35

AUTRES INTERVENANTS :

Centre de biotechnologie cellulaire : Dr Marie-Thérèse ZABOT –
Centre de Biotechnologie Cellulaire
Hospices Civils de Lyon, Centre de biologie Est,
59, Boulevard Pinel, 69677 BRON Cedex
04 72 12 97 00
marie-therese.zabot@chu-lyon.fr

Laboratoire de radiobiologie : Dr Nicolas FORAY –
Laboratoire de radiobiologie, CR-U1052 Inserm
Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon
Bât Cheney A - 1er étage,
28 Rue Laennec 69008 Lyon
04 26 55 67 94
nicolas.foray@inserm.fr

**APPROBATION ET SIGNATAIRES DU PROTOCOLE
EVIRaS****Etude de la Variabilité inter et intra Individuelle de la
Radiosensibilité des tissus Sains.**

Nom et titres des responsables	Coordonnées	Date (jj-mm-aa)	Signature
Investigateur coordonnateur	Dr Guillaume VOGIN Radiothérapeute 6 avenue de Bourgogne CS 30519 54519 Vandœuvre-lès-Nancy	26.09.12	
Investigateur Co-coordonnateur	Pr Frédéric MARCHAL Chirurgien Centre Alexis Vautrin 6 avenue de Bourgogne CS 30519 54519 Vandœuvre-lès-Nancy	26.09.12	
Méthodologiste-statisticien	Dr Emmanuel DESANDES, Médecin - Responsable de l'Unité Activité et de Statistiques Médicales - Département de l'Information Hospitalière – CAV	26.09.12	
Centre de Recherche Clinique (CAV)	Dr Véronique GILLON Responsable Centre de Recherche Clinique Centre Alexis Vautrin 6 avenue de Bourgogne CS 30519 54519 Vandœuvre-lès-Nancy	26.09.12	

SOMMAIRE

1) RESUME	7
2) JUSTIFICATION DE L'ESSAI	11
3) HYPOTHESE	12
4) OBJECTIFS	13
4.2. Objectifs secondaires	13
5) CRITERES DE JUGEMENT	13
5.1. Critères de jugement principaux	13
5.2. Critères de jugement secondaires	14
6) POPULATION DE L'ETUDE	14
6.1. Description de la population à l'étude	14
6.2. Source de recrutement	15
6.3. Critères de sélection	15
6.3.1. Critères d'inclusion	15
6.3.2. Critères de non inclusion	15
7) CONCEPTION DE LA RECHERCHE	15
7.1. Définition et durée de l'étude	15
7.2. Déroulement de la recherche	16
7.2.1. <i>Inclusion des patients et déroulement de l'étude</i>	17
8) DESCRIPTION DES DONNEES COLLECTEES	19
9) STATISTIQUES	20
9.1. Nombre de sujets nécessaires	20
9.2. Analyse statistique	20
10) CONSIDERATION ETHIQUES ET LEGISLATIVES	21
10.1. CONTROLE ET ASSURANCE QUALITE DES DONNEES	21
10.1.1. Centralisation des données	21
10.1.2. Recueil, suivi, traitement et conservation des données	21
10.2. Aspects réglementaires	22
10.2.1. Responsabilités du promoteur	22
10.2.2. Responsabilités des investigateurs	22
10.2.3. Information et Consentement des participants	23
10.2.4. Comité de Protection des Personnes et Autorité Compétente	23
10.2.5. Demande d'autorisation à la CNIL	24
10.2.6. Assurance	24

10.3. Amendements au protocole	24
10.4. Confidentialité des sujets	24
10.5. Durée de l'étude	24
10.6. Propriété des données	25
11) REGLES DE PUBLICATION	25
12) REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	27
ANNEXE I : LISTE DES INVESTIGATEURS PARTICIPANTS	30
ANNEXE II : NOTE D'INFORMATION AUX PATIENTS	31
ANNEXE III : CONSENTEMENT ECLAIRE	34
ANNEXE IV : PROCEDURES	35
ANNEXE V : ECHELLE DE TOXICITE CTCAE 4.0	36
ANNEXE VI : LA PROTEINE ATM	39

1) RESUME

Titre de l'étude	EVIRaS
Promoteur	Centre Alexis Vautrin, Centre de Lutte Contre le Cancer 6, avenue de bourgogne, 54 511 Vandœuvre-lès-Nancy, Cedex
Numéro du projet	2012-A00318-35
Version et date	Version n°2 du 26.09.12
Médecin Investigateur	Dr Guillaume VOGIN Radiothérapeute Centre Alexis Vautrin avenue de bourgogne CS 30519 54 511 Vandœuvre-lès-Nancy, Cedex Email : g.vogin@nancy.unicancer.fr ET CHR Metz-Thionville, hôpital de Mercy; 1, allée du Château - CS 45001 – 57 085 Metz Cedex 03 Email : g.vogin@chr-metz-thionville.fr
Co investigateur	Pr Frédéric MARCHAL Centre Alexis Vautrin Chirurgien avenue de bourgogne CS 30519 54 511 Vandœuvre-lès-Nancy, Cedex Email : f.marchal@nancy.unicancer.fr
Type d'étude	Il s'agit d'une étude multicentrique française de soins courants, destinée à étudier les variations intra et inter individuelles de potentiels biomarqueurs de radiosensibilité des tissus sains chez des patientes devant bénéficier de radiothérapie postopératoire à l'encontre d'adénocarcinomes mammaires infiltrant ou in situ.
Objectifs de l'étude	<u>Objectif principal</u> : Etudier la relation entre la radiosensibilité de 5 tissus du microenvironnement mammaire et 4 biomarqueurs qui influent sur les mouvements de la protéine ATM.

	<p><u>Objectifs secondaires :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - corrélation des biomarqueurs avec les toxicités aiguës cutanée, sous-cutanée, digestive et pulmonaire - corrélation des biomarqueurs sur fibroblastes avec le test sanguin - coût des procédures - délai de réponse
Critère de jugement	<p>Nous mesurerons pour chaque type cellulaire et chaque patiente le nombre moyen (et écart type) de foci γH2AX résiduels à 24h dans les noyaux des cellules d'intérêt. Ce paramètre détermine la radiosensibilité du tissu d'intérêt. 4 biomarqueurs lui seront corrélés :</p> <ul style="list-style-type: none"> -concentration noyau/cytoplasme d'ATM, évaluée par western blot -degré d'oxydation de la protéine, évaluée par immunoprécipitation et spectrométrie de masse (test colorimétrique) -intensité de l'activité kinase (quantité de fluorescence émise) mesurée par immunoprécipitation -nombre de copies d'ARNm, évalué par PCR quantitative
Méthodologie	<p>28 patientes vont être recrutées lors d'une consultation spécialisée dans le département de chirurgie au Centre Alexis Vautrin et au CHR Metz Thionville en vue d'une chirurgie carcinologique pour cancer du sein, puis inclus par le médecin investigateur selon les critères d'éligibilité.</p> <p>La période d'inclusion est fixée à octobre 2012-mars 2013.</p> <p>Avant l'inclusion, le médecin :</p> <ul style="list-style-type: none"> • explique à la patiente l'étude, • remet à la patiente la note d'information et le consentement, afin d'obtenir son accord de participation <p>Au moment de la visite d'inclusion, l'investigateur recueille le consentement de la patiente, procède à un examen clinique et relève les données individuelles de la patiente.</p>
Nombre de patients	<p>28 patientes seront incluses. L'étude est multicentrique, elle se déroulera au Centre Alexis Vautrin et au CHR Metz-Thionville.</p>

Critères d'éligibilité des patients	<p>Critères d'inclusion :</p> <ol style="list-style-type: none">1. Age: 18 à 70 ans.2. Adénocarcinome mammaire infiltrant ou in situ histologiquement documenté3. tumeur non métastatique4. tumeur non multifocale, non inflammatoire, PEV (poussée évolutive) 0 ou 1, ≤ 3 cm et N05. indication de chirurgie conservatrice6. indication de RT post-opératoire en fractionnement classique7. Irradiation au Centre Alexis Vautrin et au CHR Metz-Thionville8. OMS 0 ou 19. Affiliation à la sécurité sociale10. Consentement éclairé signé <p>Critères de non inclusion :</p> <ol style="list-style-type: none">1. antécédent de radiothérapie2. chimiothérapie néo-adjuvante3. hormonothérapie néo-adjuvante4. Tumeur avec surexpression de HER2+++5. patiente triple négative6. diabète, maladie auto-immune, maladie génétique connue7. tabagisme actif en cours8. tout traitement de fond (effet radiosensibilisant ou radioprotecteur possible)
Déroulement de l'étude	Après consentement écrit de la patiente, divers échantillons seront prélevés : 1. Lors de la chirurgie programmée, sous anesthésie générale : - une biopsie de tumeur prélevée sur la pièce opératoire - une biopsie de tissu péri-tumoral (glande mammaire saine par

	<p>exemple de laquelle nous isolerons les cellules épithéliales et les fibroblastes) en marge de la pièce opératoire</p> <ul style="list-style-type: none">- une biopsie de peau – sur le trajet de l'incision et n'en modifiant pas la taille ni la forme <p>2. Lors du bilan sanguin préopératoire programmé :</p> <ul style="list-style-type: none">- un échantillon sanguin duquel nous isolerons les lymphocytes.
Statistiques	<p>Les liens statistiques seront étudiées par le calcul de coefficients de corrélation entre les valeurs de chacun des 4 biomarqueurs et le nombre moyen de foci H2AX résiduels 24h après irradiation ex vivo, pour chaque tissu de chaque patiente. Une correction de Bonferroni appliquée aux 4 tests sera effectuée en abaissant le seuil de significativité à 0,01. (29)</p> <p>L'étude de corrélation s'effectuera par calcul du coefficient de Pearson. L'analyse statistique sera effectuée sous le logiciel R 2.14.1.</p> <p><u>Nombre de sujets nécessaires :</u></p> <p>En appliquant une correction de Bonferroni, en fixant pour chaque coefficient de corrélation un risque alpha à 0.01 et une puissance à 90%, en supposant que chaque coefficient de corrélation ne peut être inférieur à 0.65 (40% de la variance expliquée), il faudra inclure 28 sujets. (28)</p>
Calendrier	<p>Début des inclusions : octobre 2012 (les 28 patientes pourraient être incluses en 6 mois)</p> <p>Fin des inclusions : mars 2013</p> <p>Fin de l'étude : septembre 2013 (à 3 mois de la fin de la radiothérapie)</p>

2) JUSTIFICATION de L'ESSAI

200 000 patients bénéficient de radiothérapie (RT) chaque année en France. 10 à 15% sont exposés à une toxicité aiguë inhabituelle (TAI) et 3 à 5% à une toxicité tardive pouvant entraîner des séquelles parfois létales.(1-6) Une réaction est inhabituelle lorsqu'elle survient de façon significativement plus précoce ou plus sévère qu'attendu – et ceci en l'absence de déviation thérapeutique. Ces TAI justifient les seuils de dose recommandés sur les organes à risque (OAR) (7); elles sont largement attribuables à des variations inter individuelles et constitutionnelles de la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN.(5, 8) Sujettes à des dommages radio-induits de l'ADN telles que les cassures double brins (CDB), les cellules déclenchent une séquence de phosphorylations autour de complexes multi-protéiques : la DNA damage response (DDR).(9) En 2003 l'immunofluorescence indirecte (IFI) a révolutionné la recherche en radiobiologie en permettant la détection des CDB dans les noyaux cellulaires avec une résolution inégalée et pour une gamme de dose variant de 1 mGy à 10 Gy.(10) Cette technique a objectivé que les cassures double brin (CDB) non réparées sont les dommages les mieux corrélés à la radiosensibilité cellulaire.(11-13)

Les variations de radiosensibilité sont ainsi fréquemment liées à une diminution d'expression des protéines impliquées dans la détection et la réparation des cassures double-brins radio induites de l'ADN au sein des complexes précédemment mentionnés orchestrés autour d'ATM.(14-15) Ces protéines lorsqu'elles sont totalement déficientes caractérisent les réparatoses, maladies génétiques ayant en commun une hyper radiosensibilité contre indiquant tout traitement par radiothérapie.(16-19)

Toutefois dans certains syndromes accompagnés d'une hyperradiosensibilité il n'a pas été objectivé de sous expression de ce type de protéines. Ces trois syndromes (neurofibromatose de type 1(20), progeria(21) et sclérose tubéreuse de Bourneville(22)) auraient en commun une anomalie de *nucleoshuttling* de la protéine ATM qui explique le déficit fonctionnel en réparation (expériences du laboratoire, non publiées). La radiosensibilité est reversée in vitro par les inhibiteurs de farnesyl transférase [inhibiteurs de HMG-CoA-réductase (statines) et inhibiteurs de RabGGTase (biphosphonates)] ciblant précisément le trafic intracellulaire des protéines.(23) Il a été démontré que les étapes suivant la farnésylation sont indispensables au positionnement adéquat de certaines protéines.(24)

Cette étude devrait permettre de caractériser le *nucleoshuttling* (mouvement protéine entre le noyau et le cytoplasme) d'ATM dans divers tissus de radiosensibilité différente chez le même individu avant et après irradiation *ex vivo*. Nous souhaitons en outre comparer les pools nucléaire et cytoplasmique d'ATM pour le même tissu mais entre divers individus de radiosensibilité individuelle différente (patients sélectionnés après avoir présenté une toxicité inhabituelle après RT sans erreur dosimétrique vs témoins)

3) HYPOTHESE

Hypothèse 1 : les variations inter individuelles de la fonction d'ATM sont corrélées aux variations inter individuelles de la radiosensibilité.

Afin de simplifier notre modèle et notre test, de diminuer son coût, de diminuer le délai de réponse et de le rendre ainsi plus facilement éligible à une démarche de dépistage nous nous intéressons à l'influence du niveau d'expression et des modifications post traductionnelles de la protéine ATM sur la radiosensibilité : oxydation, concentration cytoplasmique vs. nucléaire, activité kinase... Nous souhaitons objectiver un paramètre corrélé avec la radiosensibilité individuelle.

Pour cela nous allons apprécier les variations interindividuelles de ces différents paramètres sur une cohorte de patientes souffrant de cancer du sein et allant bénéficier de radiothérapie post opératoire. Elles seront suivies régulièrement pendant et après leur RT selon les recommandations professionnelles.

En parallèle nous disposons des échantillons biologiques de patients ayant présenté des réactions inhabituelles et sévères à une radiothérapie dans un contexte d'hyperradiosensibilité biologique objective.

Hypothèse 2 : les variations inter tissulaires (intra individuelles) de la fonction d'ATM sont corrélées aux variations inter tissulaires (intra individuelles) de la radiosensibilité.

Pour des plans de traitement similaires, les tissus sains d'un même individu sont diversement sensibles aux radiations ionisantes. Ceci tient à des différences structurelles (organisation en série vs parallèle) et biologiques (richesse en cellules souches, différenciation, cellules en cycle...). Les cellules saines pourraient également détecter et réparer les lésions complexes radio induites au niveau de leur ADN de façon spécifique à

leur ontogénèse et leur localisation anatomique. Nous nous proposons d'évaluer la fonctionnalité de la réparation des CDB radio induites en suivant la méthode précédemment décrite (test IFI3) entre des cellules saines de différentes origines dans une cohorte de patientes souffrant de cancers du sein : fibroblastes cutanés, lymphocytes, fibroblastes mammaires, cellules épithéliales mammaires.

4) OBJECTIFS

4.1. Objectif principal

Etudier la relation entre la radiosensibilité de 5 tissus du microenvironnement mammaire et 4 biomarqueurs qui influent sur les mouvements de la protéine ATM.

4.2. Objectifs secondaires

- corrélation des ces biomarqueurs avec les toxicités aiguës cutanée, conjonctive et pulmonaire de la radiothérapie
- corrélation de ces biomarqueurs sur fibroblastes avec ceux des lymphocytes
- coût des procédures
- délai de réponse

5) CRITERES DE JUGEMENT

5.1. Critères de jugement principaux

Nous mesurerons pour chaque type cellulaire et chaque patiente le nombre moyen (et écart type) de foci γ H2AX résiduels à 24h dans les noyaux des cellules d'intérêt. Ce paramètre détermine la radiosensibilité du tissu d'intérêt. Quatre biomarqueurs lui seront corrélés :

- concentration noyau/cytoplasme d'ATM, évaluée par western blot
- degré d'oxydation de la protéine, évaluée par immunoprécipitation et spectrométrie de masse (test colorimétrique)
- intensité de l'activité kinase (quantité de fluorescence émise) mesurée par immunoprécipitation
- nombre de copies d'ARNm, évalué par PCR quantitative

5.2. Critères de jugements secondaires

- Etude de la corrélation de chaque biomarqueur avec la toxicité aiguë de la radiothérapie (grade NCI-CTCAE v4.0)
- coût de chaque test
- délai de réponse de chaque test

6) POPULATION DE L'ETUDE

6.1. Description de la population à l'étude

Dans cette étude, les femmes non fumeuses, en bon état général, ne prenant pas de traitement médical au long cours et souffrant d'un adénocarcinome du sein localisé documenté sont éligibles. Le traitement débutera par une chirurgie conservatrice, suivie dans les 12 semaines par une radiothérapie au Centre Alexis Vautrin.

- Pour les adénocarcinomes canaux in situ, après chirurgie conservatrice, l'irradiation de la glande mammaire est indiquée.(21)
- Pour les adénocarcinomes infiltrants, une irradiation de la glande mammaire est toujours indiquée en complément de la chirurgie conservatrice. Elle diminue le risque de récurrence loco-régionale de 70 % et réduit le risque de mortalité à long terme.(22) Une irradiation additionnelle du lit tumoral (boost) réduit le risque de récurrence locale, elle est donc indiquée en présence de facteurs de risque de récurrence identifiés, quel que soit l'âge.(23) La radiothérapie des aires ganglionnaires est réalisée en cas d'envahissement ganglionnaire axillaire prouvé histologiquement et > 2 mm

Le schéma de référence, pour tous les volumes traités est de 50 Gy en 25 fractions sur 33 jours. L'irradiation complémentaire du lit tumoral est réalisée à la dose de 10 à 16 Gy en 5 à 8 fractions après le traitement de la glande mammaire. Les patientes seront reçues en consultation une fois par semaine durant ce traitement (réglementaire) afin d'apprécier la tolérance.

En cas d'indication de chimiothérapie adjuvante posée en réunion de concertation pluridisciplinaire une fois le rapport d'anatomie pathologique définitif édité, la patiente sera sortie d'étude.

La consultation prévue à 3 mois de la radiothérapie sera réalisée auprès du radiothérapeute afin de colliger les toxicités aiguës définitives. (cut-off : 90 jours)

6.2. Source de recrutement

Les patientes seront recrutées au cours la consultation de chirurgie initiale au CAV.

6.3. Critères de sélection

6.3.1. Critères d'inclusion

1. Age: 18 à 70 ans.
2. Adénocarcinome mammaire infiltrant ou in situ histologiquement documenté
3. tumeur non métastatique
4. tumeur non multifocale, non inflammatoire, PEV (poussée évolutive) 0 ou 1, ≤ 3 cm et N0
5. indication de chirurgie conservatrice
6. indication de RT post-opératoire en fractionnement classique
7. Irradiation au Centre Alexis Vautrin et au CHR Metz-Thionville
8. OMS 0 ou 1
9. Affiliation à la sécurité sociale
10. Consentement éclairé signé

6.3.2. Critères de non inclusion

1. antécédent de radiothérapie
2. chimiothérapie néo-adjuvante
3. hormonothérapie néo-adjuvante
4. Tumeur avec surexpression de HER2+++
5. patiente triple négative
6. diabète, maladie auto-immune, maladie génétique connue
7. tabagisme actif en cours
8. tout traitement de fond (effet radiosensibilisant ou radioprotecteur possible)

7) CONCEPTION DE LA RECHERCHE

7.1. Définition et durée de l'étude

Etude prospective multicentrique d'identification de biomarqueurs de radiosensibilité individuelle

Durée 1 an (inclusions : 6 mois ; délai chirurgie-RT : 3 mois ; visite de fin d'étude à 3 mois)

7.2. Déroulement de la recherche

Après consentement écrit de la patiente, divers échantillons seront prélevés :

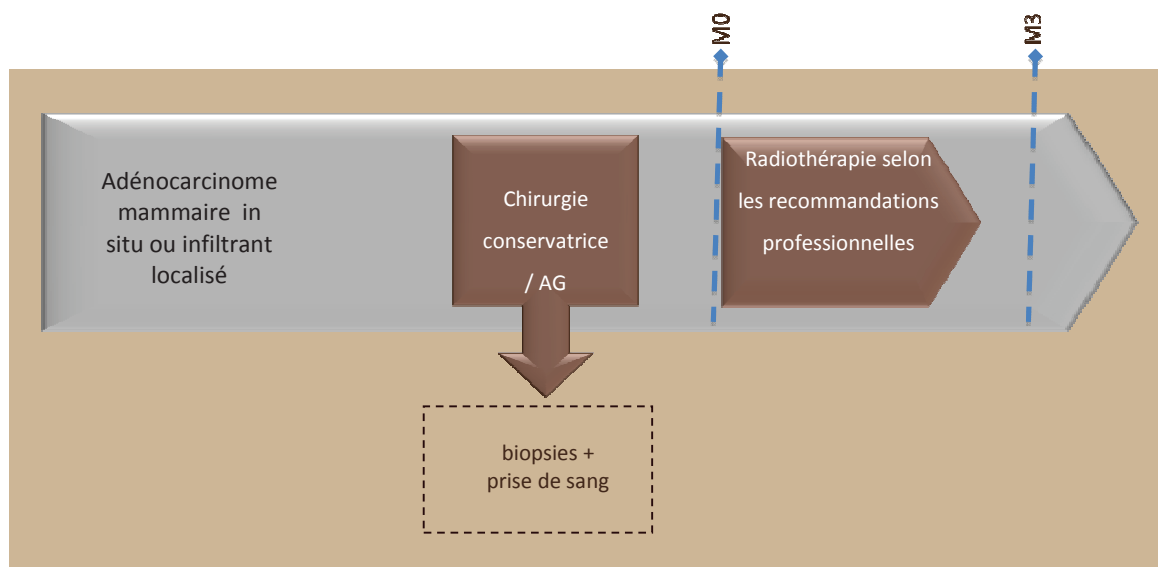
1. Lors de la chirurgie programmée, sous anesthésie générale :
 - une biopsie de tumeur prélevée sur la pièce opératoire
 - une biopsie de tissu péri tumoral (glande mammaire saine par exemple de laquelle nous isolerons les cellules épithéliales et les fibroblastes) en marge de la pièce opératoire
 - une biopsie de peau – sur le trajet de l'incision et n'en modifiant pas la taille ni la forme, ni la cicatrisation
2. Lors du bilan sanguin préopératoire :
 - un échantillon sanguin duquel nous isolerons les lymphocytes.

Des lignées primaires de cellules épithéliales mammaires, fibroblastes mammaires, fibroblastes dermiques et cellules tumorales seront cultivées dans le centre de biotechnologie cellulaire des Hospices Civils de Lyon (Dr M-T Zobot) et seront ensuite adressées au laboratoire de radiobiologie (Inserm CRU-1052) où les tests spécifiques seront réalisés (immunofluorescence indirecte, séparation des compartiments nucléaire et cytoplasmique, western blot, activité kinase). La PCR quantitative ainsi que l'activité oxydation seront réalisées par des équipes collaboratrices Dr Sicard-Roselli, Orsay et Dr Badie, Oxford).

Du fait de l'abondance des lymphocytes dans le prélèvement sanguin, les mesures seront directement réalisées au laboratoire de radiobiologie sans constituer au préalable de lignée primaire.

Dans l'intervalle, la patiente débutera sa radiothérapie au Centre Alexis Vautrin ou au CHR Metz-Thionville. Les toxicités aiguës (cutanée, pulmonaire, digestive haute) seront reportées par le radiothérapeute chaque semaine comme le prévoient les bonnes pratiques.

La visite de fin d'étude aura lieu à 3 mois du début de la RT et sera réalisée par le radiothérapeute. Ce délai de 90 jours marque la fin de la période définissant la toxicité aiguë.



7.2.1. Inclusion des patients et déroulement de l'étude

Bilan d'inclusion :

Il comprendra :

- Le recueil du consentement éclairé signé après information du patient
- Le recueil, la vérification et la validation des critères d'inclusion/exclusion à partir de la visite initiale

Bilan au cours de l'étude :

Il ne sera réalisé aucun bilan clinique ou paraclinique additionnel non prévu dans la prise en charge conventionnelle des patientes.

Visite de suivi :

Selon les recommandations professionnelles, les patientes doivent consulter quatre fois par an les premières années suivant le diagnostic de cancer du sein en alternance auprès de l'oncologue, du gynécologue, du radiologue et du médecin traitant. La première visite de suivi prévue à 3 mois sera réalisée auprès du radiothérapeute. La toxicité aigue définitive sera reportée et marquera la fin de l'essai.

Tableau récapitulatif du déroulement de l'essai :

Tableau récapitulatif des investigations									
	Bilan d'inclusion	Jour de la Chirurgie (classique)	Visites hebdomadaires en cours de radiothérapie (classique)						Bilan à 3 mois
VISITES	V0		V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7
BILAN INITIAL									
Consentement éclairé signé	x								
Critères d'inclusion/exclusion	x								
Anamnèse médicale	x								
Traitements concomitants	x								
BILAN CLINIQUE									
Examen clinique initial	x								
BIOPSIES		x							
Prélèvement sanguin (4 mL)		x							
SUIVI									
Evaluation des toxicités aiguës liées à la RT			x	x	x	x	x	x	x

7.2.2. Arrêt prématuré de l'essai

Sortie prématurée :

Seule la nécessité d'une chimiothérapie adjuvante après la chirurgie conservatrice est considéré comme une sortie prématurée d'étude. Elle n'est généralement pas anticipable au moment de la chirurgie et est retenue en réunion de concertation pluri disciplinaire au vu de critères histo pronostiques péjoratifs constatés sur le rapport d'anatomie pathologique définitif.

Les arrêts prématurés ou les refus de traitement ne sont pas considérés comme des sorties d'étude. En cas de rechute carcinologique, un bilan d'évaluation du statut tumoral doit alors être réalisé, de même que le suivi. En accord avec le médecin investigateur, le patient décidera ou non d'interrompre l'essai dans ce contexte.

Arrêt prématuré de l'étude :

L'étude pourra être interrompue pour des raisons administratives, et/ou sur décision du promoteur.

Si l'étude est arrêtée prématurément ou suspendue, le Promoteur informera immédiatement les investigateurs et le Comité de Protection des Personnes CPP de la raison de l'arrêt ou de la suspension.

Dans tous les cas, un suivi des patients doit être réalisé par l'investigateur.

7.2.3. Enregistrement des événements indésirables (Article R.1123-39 du code de la santé publique)

Toute manifestation nocive survenant chez une personne qui se prête à une recherche biomédicale, que cette manifestation soit liée ou non à la recherche ou au produit sur lequel porte cette recherche. Les événements indésirables graves ou non seront enregistrés dans le CRF individuel du patient.

On entend par événement indésirable grave, tout événement entraînant pour le patient :

- une hospitalisation ou une prolongation de l'hospitalisation
- une incapacité ou une invalidité permanente
- la mise en jeu du pronostic vital
- ou le décès.

Définition des événements indésirables graves ou non graves

Les critères et définitions classiques seront utilisés. En particulier un événement indésirable sera classé « grave » si : induit le décès, met la vie du patient en danger, nécessite une hospitalisation ou prolonge une hospitalisation, induit une morbidité significative et/ou une incapacité.

8) DESCRIPTION DES DONNEES COLLECTEES

Un cahier d'observation sera mis en place par le Dr Véronique GILLON, pharmacien, responsable du Centre de Recherche Clinique du Centre Alexis VAUTRIN. La saisie des données et le contrôle qualité seront réalisés par les AECs (Assistants d'Etudes Cliniques de l'unité de Recherche Clinique du Centre Alexis VAUTRIN). L'ensemble des données cliniques sera validé par le Dr Emmanuel DESANDES, responsable de l'Unité Activité et Statistiques Médicales qui assurera également l'analyse statistique.

Le cahier d'observation individuel du patient comportera notamment:

- 1 Les données démographiques
- 2 Les habitudes (notamment tabagisme)
- 3 La description de la maladie (données histologiques et stade)
- 4 Les antécédents médicaux (diabète, maladie inflammatoire chronique, maladie génétique, immunodéficience..)
- 5 Les données médicales initiales dont IMC, volume du sein (tour de poitrine et bonnet)
- 6 Les heures des bilans sanguins usuels péri opératoires
- 7 Les traitements administrés (chirurgie, radiothérapie)
- 8 Les données médicales du patient pendant le suivi notamment concernant la toxicité aiguë à la RT (annexe V)
- 9 La traçabilité des lignées cellulaires établies à partir des divers prélèvements
- 10 Les paramètres radiobiologiques mesurés sur ces lignées
- 11 L'enregistrement des événements indésirables et des événements indésirables graves pendant la période de la recherche

Les données individuelles du patient seront anonymisées

9) STATISTIQUES

9.1. Nombre de sujets nécessaires

En appliquant une correction de Bonferroni, en fixant pour chaque coefficient de corrélation un risque alpha à 0.01 et une puissance à 90%, en supposant que chaque coefficient de corrélation ne peut être inférieur à 0.65 (40% de la variance expliquée), il faudra inclure 28 sujets. (28)

9.2. Analyse statistique

Les liens statistiques seront étudiées par le calcul de coefficients de corrélation entre les valeurs de chacun des 4 biomarqueurs et le nombre moyen de foci H2AX résiduels 24h après irradiation ex vivo, pour chaque tissu de chaque patiente. Une correction de Bonferroni appliquée aux 4 tests sera effectuée en abaissant le seuil de significativité à 0,01. (29)

L'analyse statistique sera effectuée sous le logiciel R 2.14.1.

En parallèle, nous relèverons la toxicité aiguë à la radiothérapie. Le suivi des patientes sera réalisé sur une période de trois mois après la fin de la radiothérapie par les investigateurs et la toxicité aiguë cutanée, muqueuse, pulmonaire et conjonctive à la radiothérapie sera gradée selon l'échelle NCI-CTCAE v4.0 (0 à 5).

10) CONSIDERATION ETHIQUES ET LEGISLATIVES

10.1. Contrôle et assurance qualité des données

10.1.1. Centralisation des données

Afin de garantir l'authenticité et la crédibilité des données, conformément aux Bonnes Pratiques Cliniques, le Promoteur met en place un système d'assurance qualité qui comprend :

10.1.2. Recueil, suivi, traitement et conservation des données

Tous les documents de l'étude sont considérés comme confidentiels.

Toutes les données requises par cette recherche doivent être consignées, dans les meilleurs délais dans les cahiers d'observation de l'essai. L'entrée des données dans le cahier d'observation doit être faite à l'aide d'un stylo à bille et doit être lisible. Les crayons et fluides ne doivent pas être utilisés.

Si des corrections s'avèrent nécessaires, elles sont faites par l'investigateur ou un membre autorisé de son équipe.

Les données seront ensuite saisies dans la base de données créée à cet effet.

10.1.3. Traitement et gestion de la base de données

La collecte des données cliniques reposera sur la mise en place d'une base de données clinique et la création de masques de saisie à l'image du cahier d'observation en conformité avec le protocole et les réglementations actuellement en vigueur.

La structure de la base de données et des écrans de saisie sera approuvée par l'investigateur co-ordinateur de l'essai.

10.1.4. Conservation des données

Tous les documents sont considérés comme confidentiels.

A la fin de l'étude, les médecins investigateurs principaux conserveront sous leur responsabilité, dans leurs centres respectifs, l'ensemble des documents relatifs à l'étude (copie de protocole, copies de cahiers d'observation, dossier investigateur, liste d'identification des patients, apports d'examen cliniques etc.....), pour un archivage pendant minimum 15 années sous tous les documents relatifs à l'étude, toutes les données recueillies et leurs analyses sont la propriété du Centre Alexis Vautrin. Ils devront obligatoirement être archivés par l'investigateur coordinateur pour une durée de 15 ans au Centre Alexis Vautrin (arrêté du 08 Novembre 2006).

10.2. Aspects réglementaires

10.2.1. Responsabilités du promoteur

Le promoteur de l'étude clinique (Centre Alexis Vautrin), prend l'initiative de cette recherche ; il assure la gestion et vérifie que son financement est prévu.

Les principales responsabilités du promoteur sont :

- l'obligation de souscription d'une assurance de responsabilité civile,
- la demande d'avis du projet initial et des amendements substantiels auprès du CPP,
- la demande d'un numéro d'enregistrement du projet initial et des amendements substantiels auprès de l'autorité compétente,
- la déclaration à l'autorité compétente du début et de la fin de l'étude,
- la rédaction du rapport final de l'étude,
- l'information des résultats de l'étude à l'autorité compétente, au CPP et aux participants à la recherche,
- l'archivage des documents essentiels de l'étude dans le classeur promoteur pour une durée minimale de 15 ans après la fin de la recherche.

10.2.2. Responsabilités des investigateurs

Les investigateurs s'engagent à ce que cette étude soit réalisée en conformité avec la loi Huriet (N°88-1138) du 20 Décembre 1988 relative à la protection des personnes modifiée par la loi de santé publique (N°2004-806) du 9 Août 2004, les lois bioéthiques (N°2004-800) du 6 Août 2004, la loi informatique et liberté (N°78-17) du 6 Janvier 1978 modifiée par la loi relative à la protection des personnes physiques à l'égard des traitements à caractère

personnel (N° 2004-801) du 6 Août 2004, ainsi qu'en accord avec les bonnes pratiques cliniques de la Conférence Internationale d'Harmonisation (ICH-E6 17/07/96) et aux principes éthiques de la dernière version en vigueur de la déclaration d'Helsinki.

Toutes les données, tous les documents et rapports pourront faire l'objet d'audits de l'inspection réglementaire.

L'investigateur principal s'engage à conduire l'étude clinique conformément au protocole qui a été autorisé par le CPP.

L'investigateur ne doit apporter aucune modification au protocole sans l'autorisation écrite du promoteur et sans que le CPP et l'autorité compétente ait donné leur autorisation sur les modifications proposées.

Il est de la responsabilité de l'investigateur principal :

- De fournir au promoteur son curriculum vitae,
- D'identifier les membres de son équipe qui participent à l'étude et de définir leurs responsabilités,
- De démarrer le recrutement des patients après autorisation du promoteur,
- D'obtenir l'accord de participation du patient avant de l'inclure dans l'étude,
- De reporter les informations médicales dans le cahier d'observation conformément au protocole

10.2.3. Information et Consentement des participants

Préalablement à la réalisation d'une recherche biomédicale visant à l'évaluation des soins courants sur des personnes, l'investigateur informe de façon exhaustive l'étude aux patients, le consentement libre, éclairé et écrit est remis aux patients pour signature, il est ensuite recueilli et signé par l'investigateur. Cette étude rentre dans la catégorie de soins courants, il n'y a pas d'obligation de recueil de consentement éclairé et signé dans cette catégorie d'étude, mais juste l'obligation d'informer de façon complète et loyale en termes compréhensibles, le patients des objectifs de l'étude, de ses droits de refuser de participer à l'étude ou de la possibilité de se rétracter à tout moment. Toutes ces informations figurant sur une note d'information et de non opposition remis au patient.

10.2.4. Comité de Protection des Personnes et Autorité Compétente

L'étude sera menée en conformité avec la réglementation en vigueur et sera soumise au Comité de Protection des Personnes CPP III-Est par le promoteur.

10.2.5. Demande d'autorisation à la CNIL

Le promoteur a adhéré à la méthodologie MR001 pour ce qui concerne la protection et la confidentialité des données individuelles des personnes qui se prêtent à la recherche. Le n° d'enregistrement est le 1422639. Ce projet fera donc l'objet d'une déclaration simplifiée auprès de la CNIL après obtention d'une autorisation du CPP Est III.

.En effet, toute donnée ou information collectée au cours de l'étude sera anonymisée et conformément au texte de la loi n°78-17 du 6 Janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, les données de cette étude seront enregistrées dans une base de données informatique gérée par le centre coordonnateur de l'étude (Centre Alexis Vautrin).

10.2.6. Assurance

Dans la mesure où la recherche est bien qualifiée de Recherche en soins courants par le CPP sollicité (dans notre cas CPP III-Est), ce qui signifie l'absence de risque supplémentaire liée à l'étude, l'assurance sera celle de l'établissement responsable des soins (article L.1142-2)

10.3. Amendements au protocole

Dans le cas où des modifications au protocole s'avèreraient nécessaires, elles seront d'abord soumises à l'avis du promoteur de l'étude. Après réception de l'accord du , ces amendements seront ensuite soumis à l'avis du CPP III-Est.

De même, si des modifications ont été effectuées dans le protocole concernant les données recueillies (nouvelles données, augmentation de la durée du suivi.....), le protocole doit être soumis à nouveau au Comité consultatif sur le traitement de l'information en matière de recherche dans le domaine de la santé puis à la CNIL.

10.4. Confidentialité des sujets

L'investigateur s'assurera que l'anonymat de chaque patient participant à l'étude est garanti en attribuant lors de l'inclusion des patients un numéro d'ordre et en n'utilisant que les initiales comme mode d'identification.

10.5. Durée de l'étude

Le début de l'essai est prévu pour octobre 2012 sous réserve d'obtention d'avis favorable du CPP. La période de l'essai est estimée 1 an. Cette durée correspond à la période d'inclusion et de suivi des patients.

10.6. Propriété des données

L'investigateur s'engage, pour lui même et pour toutes les personnes amenées à suivre le déroulement de l'étude, à garantir la confidentialité de toutes les informations fournies du début de l'étude jusqu'à la publication des résultats. Cette obligation de confidentialité ne s'appliquera pas aux renseignements que l'investigateur sera amené à communiquer aux patients dans le cadre de leur participation à l'étude ni aux informations déjà publiées.

Les investigateurs s'engagent à ne pas publier, divulguer ou utiliser, de quelque façon que ce soit, directement ou indirectement, les informations scientifiques ou techniques en relation avec l'étude.

Néanmoins, conformément à l'article R 5121-13 du Code de la Santé Publique, le centre et l'investigateur coordonnateur pourront donner des informations relatives à l'étude au (x) :

- ministre chargé de la santé,
- médecins inspecteurs de santé publique,
- pharmaciens inspecteurs de santé publique,
- Directeur Général et inspecteurs de l'Afssaps.

Toutes les données de l'étude sont la propriété du Centre Alexis Vautrin.

11) REGLES DE PUBLICATION

Toutes les informations résultant de cet essai sont considérées comme confidentielles jusqu'à la publication des résultats. Toutes les données étant confidentielles, ce qui est confié à Lyon pour l'exploitation est donc confidentiel.

Le coordonnateur sera cité en premier auteur lors de toute publication qui résultera de cette étude et le directeur de thèse à Lyon en dernier auteur.

Toutes les publications, abstracts ou présentations comprenant les résultats de l'essai doivent être soumis au préalable pour approbation au promoteur (CAV) et le promoteur sera cité avec au moins un auteur dans les 3 premières places.

Les données générées par le centre de radiobiologie de Lyon font partie de l'étude mais leur moyen d'obtention grâce à un algorithme spécifique est secret et reste propriétaire du centre de radiobiologie de Lyon.



CONFIDENTIEL

Protocole : EVIRaS
RCB : 2012-A00318-35

Par ailleurs, toutes les communications orales ou écrites, manuscrits ou présentations doivent comporter une rubrique qui mentionne impérativement le CAV comme promoteur de l'essai.

12) REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Bourne RG, Kearsley JH, Grove WD, Roberts SJ. The relationship between early and late gastrointestinal complications of radiation therapy for carcinoma of the cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1983 Oct;9(10):1445-50.
2. Bentzen SM, Overgaard J. Patient-to-Patient Variability in the Expression of Radiation-Induced Normal Tissue Injury. *Semin Radiat Oncol*. 1994 Apr;4(2):68-80.
3. Mohanti BK, Bansal M. Late sequelae of radiotherapy in adults. *Support Care Cancer*. 2005 Oct;13(10):775-80.
4. Pommier P, Gomez F, Sunyach MP, D'Hombres A, Carrie C, Montbarbon X. Phase III randomized trial of Calendula officinalis compared with trolamine for the prevention of acute dermatitis during irradiation for breast cancer. *J Clin Oncol*. 2004 Apr 15;22(8):1447-53.
5. Tucker SL, Turesson I, Thames HD. Evidence for individual differences in the radiosensitivity of human skin. *Eur J Cancer*. 1992;28A(11):1783-91.
6. Turesson I. Individual variation and dose dependency in the progression rate of skin telangiectasia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1990 Dec;19(6):1569-74.
7. Emami B, Lyman J, Brown A, Coia L, Goitein M, Munzenrider JE, et al. Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1991 May 15;21(1):109-22.
8. Rube CE, Fricke A, Wendorf J, Stutzel A, Kuhne M, Ong MF, et al. Accumulation of DNA double-strand breaks in normal tissues after fractionated irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. Mar 15;76(4):1206-13.
9. Jackson SP. The DNA-damage response: new molecular insights and new approaches to cancer therapy. *Biochemical Society transactions*. 2009 Jun;37(Pt 3):483-94.
10. Rothkamm K, Lobrich M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003 Apr 29;100(9):5057-62.
11. Freifelder D. Mechanism of inactivation of coliphage T7 by x-rays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1965 Jul;54(1):128-34.
12. Iliakis G. The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. *Bioessays*. 1991 Dec;13(12):641-8.
13. Kemp LM, Sedgwick SG, Jeggo PA. X-ray sensitive mutants of Chinese hamster ovary cells defective in double-strand break rejoining. *Mutation research*. 1984 Nov-Dec;132(5-6):189-96.
14. 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 Nov;74(5):551-60.
15. 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. *International journal of radiation biology*. 1997 Sep;72(3):271-83.
16. Bohgaki T, Bohgaki M, Hakem R. DNA double-strand break signaling and human disorders. *Genome integrity*. 1(1):15.
17. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 2001 May 17;411(6835):366-74.
18. Arlett CF, Harcourt SA. Survey of radiosensitivity in a variety of human cell strains. *Cancer Res*. 1980 Mar;40(3):926-32.
19. Deschavanne PJ, Fertil B. A review of human cell radiosensitivity in vitro. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1996 Jan 1;34(1):251-66.
20. Hannan MA, Sackey K, Sigut D. Cellular radiosensitivity of patients with different types of neurofibromatosis. *Cancer Genet Cytogenet*. 1993 Apr;66(2):120-5.
21. Rainbow AJ, Howes M. Decreased repair of gamma ray damaged DNA in progeria. *Biochem Biophys Res Commun*. 1977 Jan 24;74(2):714-9.
22. Hayashi A, Yoshida Y, Tanaka H, Arima M, Ohno K. Variable radiosensitivity in fibroblasts from patients with tuberous sclerosis. *J Invest Dermatol*. 1985 Jan;84(1):77-8.
23. 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 Jul;14(7):767-72.
24. Magee T, Seabra MC. Fatty acylation and prenylation of proteins: what's hot in fat. *Curr Opin Cell Biol*. 2005 Apr;17(2):190-6.
25. Julien JP, Bijker N, Fentiman IS, Peterse JL, Delledonne V, Rouanet P, et al. Radiotherapy in breast-conserving treatment for ductal carcinoma in situ: first results of the EORTC randomised phase III trial 10853. *EORTC Breast Cancer Cooperative Group and EORTC Radiotherapy Group. Lancet*. 2000 Feb 12;355(9203):528-33.
26. Fisher B, Jeong JH, Anderson S, Bryant J, Fisher ER, Wolmark N. Twenty-five-year follow-up of a randomized trial comparing radical mastectomy, total mastectomy, and total mastectomy followed by irradiation. *The New England journal of medicine*. 2002 Aug 22;347(8):567-75.

27. Bartelink H, Horiot JC, Poortmans PM, Struikmans H, Van den Bogaert W, Fourquet A, et al. Impact of a higher radiation dose on local control and survival in breast-conserving therapy of early breast cancer: 10-year results of the randomized boost versus no boost EORTC 22881-10882 trial. *J Clin Oncol*. 2007 Aug 1;25(22):3259-65.
28. Cohen J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*: Academic Press; 1977.
29. Curtin F, Schulz P. Multiple correlations and Bonferroni's correction. *Biological psychiatry*. 1998 Oct 15;44(8):775-7.



CONFIDENTIEL

Protocole : EVIRaS
RCB : 2012-A00318-35

13)ANNEXES

ANNEXE I : LISTE DES INVESTIGATEURS PARTICIPANTS

Centre	Nom et titres des responsables	Coordonnées
Centre Alexis Vautrin 6 avenue de bourgogne CS 30519 – 54519 Vandoeuvre-les- Nancy Cedex	Investigateur coordonnateur	Dr Guillaume VOGIN Radiothérapeute Centre Alexis Vautrin 6 avenue de bourgogne CS 30519 - 54519 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex Tél : 03 83 59 84 27- Fax : 03 83 59 83 91 Email : g.vogin@nancy.unicancer.fr
	Investigateur Co-coordonnateur	Pr Frédéric MARCHAL Chirurgien Centre Alexis Vautrin 6 avenue de bourgogne CS 30519 - 54519 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex Tél : 03 83 59 84 51 – Fax 03 83 59 85 47 Email : f.marchal@nancy.unicancer.fr
	Investigateur	Dr Sophie RENARD-OLDRINI Radiothérapeute Centre Alexis Vautrin 6 avenue de Bourgogne CS 30519 – 54519 Vandoeuvre-lès-Nancy Tél : 03 83 59 84 27- 03 83 59 83 91 Email : s.renard@nancy.unicancer.fr
CHR METZ THIONVILLE Hôpital de Mercy; 1, allée du Château - CS 45001 – 57 085 Metz Cedex 03	Investigateur Principal	Dr Philippe QUETIN Radiothérapeute CHR Metz-Thionville, Hôpital de Mercy; 1, allée du Château - CS 45001 – 57 085 Metz Cedex 03 Email : p.quetin@chr-metz-thionville.fr
	Co-investigateur	Dr Michel GUNTHER CHR Metz-Thionville, Hôpital de Mercy; 1, allée du Château - CS 45001 – 57 085 Metz Cedex 03 E. mail : m.gunther@chr-metz-thionville.fr

ANNEXE II: NOTICE D'INFORMATION AUX PATIENTS PARTICIPANT A LA RECHERCHE BIOMEDICALE**Etude de la variabilité inter et intra individuelle de la radiosensibilité des tissus sains.****EVIRaS**

Promoteur : Centre Alexis Vautrin
6 Avenue de Bourgogne CS 30519 – 54519 Vandoeuvre-lès-Nancy

Investigateur-Coordonnateur :
Dr Guillaume VOGIN
Centre Alexis Vautrin
6 Avenue de Bourgogne CS 30519 – 54519 Vandoeuvre-lès-Nancy

Madame, Mademoiselle,

Le médecin qui vous prend en charge, vous propose de participer à cette évaluation dans le cadre d'une étude clinico-biologique menée au Centre Alexis Vautrin.

Avant de vous décider à participer à cette étude, il est important que vous en compreniez les objectifs. Ce document a été conçu afin de vous donner des informations détaillées sur cette étude. Vous êtes libre de discuter votre participation avec les membres de votre famille, vos amis ou votre médecin traitant. Vous pouvez poser toutes les questions qui pourraient vous venir à l'esprit au médecin qui vous a proposé de participer à l'étude.

➤ ***Quel est l'objectif de l'étude ?***

L'équipe médicale en charge de votre santé a estimé qu'un traitement par radiothérapie (RT) sera nécessaire après votre intervention. Environ 200 000 patients sont traités par RT chaque année en France.

Tout être vivant a une certaine capacité à réparer plus ou moins bien les dommages causés par les radiations ionisantes au niveau de ses cellules. Des séquelles à plus ou moins long terme peuvent être observées chez moins de 10% des patients sans possibilité de les prévenir pour le moment. Notre équipe cherche à développer un test permettant d'expliquer pourquoi certains adultes présentent des réactions inhabituelles aux rayons et de prévenir ces réactions.

➤ ***Qu'est-ce que votre participation à l'étude implique pour vous ?***

En participant à cette étude, vous acceptez que les données médicales vous concernant soient recueillies et analysées. Votre traitement ainsi que votre prise en charge globale sera classique pour ce type de pathologie que vous acceptiez ou non de participer à l'étude.

Afin de faire progresser la connaissance, les résultats de cette étude associés à ceux d'autres malades feront l'objet d'analyses comparatives et seront publiés dans des revues scientifiques spécialisées sous forme totalement anonyme concernant les personnes à l'origine des prélèvements.

➤ **Quel est le déroulement de l'étude ?**

Le jour de l'intervention, une très petite quantité de cellules sera prélevée par votre chirurgien à la fois au niveau de votre sang (un tube de 4 mL), de votre peau, de votre tumeur et de votre sein (chacune de 2 mm de diamètre). La procédure chirurgicale habituelle ne sera pas modifiée par ces prélèvements qui ne laisseront aucune trace définitive sur votre corps. En particulier, le prélèvement de peau sera réalisé sur le trajet de votre incision, là où la cicatrice se trouvera. Ni sa taille ni sa forme ne seront modifiées. Le prélèvement sanguin sera réalisé au moment de la prise de sang prescrite par votre anesthésiste la veille de l'intervention. Elle ne nécessitera pas de ponction spécifique. Enfin les cellules de sein et de tumeur seront prélevées directement sur la pièce opératoire qui sera retirée par le chirurgien.

Les prélèvements en dehors du sang seront envoyés au laboratoire de biotechnologie cellulaire des Hospices Civils de Lyon où ils seront mis en culture puis transmis au Groupe de Radiobiologie CRU 1052 de l'INSERM. Ils seront irradiés au moyen d'un appareil de RT puis les tests seront réalisés à différents moments après l'irradiation. Votre prélèvement sanguin sera quant à lui directement envoyé au Groupe de Radiobiologie CRU 1052 de l'INSERM où certains globules blancs seront isolés, puis irradiés avant de subir les mêmes analyses.

➤ **Combien de personnes participeront à cette étude ?**

28 patientes participeront à cette étude.

➤ **Quelle est la durée de votre participation à cette étude ?**

Les prélèvements se feront lors de votre chirurgie – qui restera exactement la même que vous participez ou non à cette étude. Un à trois mois après celle-ci, vous devriez débiter votre RT au Centre Alexis Vautrin pour une durée de 5 à 6 semaines. Pendant celle-ci, vous serez reçue une fois par semaine par votre radiothérapeute qui évaluera la façon dont votre organisme tolère le traitement. A trois mois, vous serez reconvoquée par votre radiothérapeute pour réaliser une dernière évaluation qui marque la fin de votre implication dans cette étude.

➤ **Quels sont les risques possibles ?**

Les biopsies sont un acte sans danger, réalisé sous anesthésie et ne laissant pas de cicatrice visible. Le risque d'infection locale et de saignement est faible et facilement contrôlé par et des mesures locales simples. Puisque ces biopsies sont réalisées pendant l'intervention chirurgicale sur des sites qui seront concernés par une incision programmée, aucun excès de risque ne sera induit par ces prélèvements.

Le prélèvement supplémentaire de 4.0 ml de sang n'aura aucun impact sur votre taux d'hémoglobine. 4 ml de sang ne représentent que 1/1000^{ème} de votre volume sanguin. Ce prélèvement ne nécessite pas de ponction veineuse à un autre site.

➤ **Vos droits**

Vous n'êtes en aucun cas obligé de prendre part à l'étude. Un refus de participation ne modifiera en aucune façon vos rapports avec l'équipe médicale qui vous a pris en charge, et la qualité de vos soins n'en sera nullement affectée.

Les informations vous concernant sont strictement confidentielles et anonymisées. Votre dossier médical restera confidentiel et ne pourra être consulté que sous la responsabilité du médecin s'occupant de votre traitement. Peuvent aussi consulter votre dossier les autorités de sante et les personnes dument mandatées par l'organisateur de la recherche. Toutes sont soumises au secret professionnel.

Conformément aux dispositions de Loi relative a l'informatique et aux libertés (Loi n°78-17 du 6 janvier 1978 modifiée par la loi n°2004-801 du 6 aout 2004), vous disposez d'un droit d'accès, de rectification des données vous concernant et d'opposition a la transmission de ces données. Ce droit s'exerce auprès de votre médecin auriculothérapeute qui seul connait votre identité.

De plus selon les dispositions de la loi n° 2002-303 du 4 mars 2002 relative aux droits des malades, vous serez informe, à votre demande, des résultats globaux de l'étude par l'investigateur.

Cette étude est réalisée conformément aux dispositions du Code de la Sante Publique relatives aux recherches biomédicales. Dans ce cadre, elle a reçu l'avis favorable du Comité de Protection des Personnes CPP EST III en date du _____2012.

➤ ***Des questions ?***

L'étude est menée dans votre établissement de soins sous la responsabilité du Dr Guillaume VOGIN. Celui-ci reste à votre disposition pour vous donner les renseignements et explications complémentaires que vous souhaitez à l'occasion des consultations prévues pendant et après la période de traitement. N'hésitez pas à reprendre rendez-vous si vous avez besoin d'autres informations.

ANNEXE III : CONSENTEMENT ECLAIRE**Etude de la variabilité inter et intra individuelle de la radiosensibilité des tissus sains.**

Je soussigné(e) (nom,prénom)_____

Demeurant à_____

Reconnais avoir été informé (e) par le Docteur_____ des objectifs et des désagréments pouvant résulter du prélèvement de peau, de tumeur et de tissu péri-tumoral ainsi que d'un échantillon sanguin pour l'étude des capacités de réparation de mes cellules face aux dommages causés par une irradiation.

Je déclare avoir reçu une note d'information concernant cette étude. Son objectif, ses contraintes et sa durée de réalisation m'ont été clairement expliqués, et j'ai eu la possibilité de poser toutes les questions que je souhaitais.

Je comprends que je suis libre d'accepter ou non de participer à cette étude, et que je peux demander à tout moment de m'en retirer sans avoir à en préciser les raisons, et sans compromettre la qualité des soins qui continueront à m'être prodigués, ni ma relation avec l'équipe soignante.

J'atteste par ailleurs être affilié a un régime de sécurité sociale.

Mon consentement ne décharge pas les organisateurs de la recherche de leurs responsabilités. Je conserve tous mes droits garantis par la loi.

Les données qui me concernent resteront strictement confidentielles. Je n'autorise leur consultation que par les personnes mandatées par le responsable de l'étude (le Centre Alexis Vautrin de Vandœuvre-lès-Nancy) et par les représentants des Autorités Réglementaires de Santé.

J'accepte que les données qui me concernent fassent l'objet d'un traitement informatisé par le promoteur. Je dispose d'un droit d'accès et de rectification relatif à ces données prévu par la loi Informatique et Liberté du 06 janvier 1978.



CONFIDENTIEL

Protocole : EVIRaS
RCB : 2012-A00318-35

Je donne mon accord pour la réalisation des prélèvements et des techniques d'analyses biologiques y compris génétiques, qui sont prévues dans le cadre de l'étude.

Ces prélèvements et leurs dérivés seront conservés sauf contrordre de ma part

Je donne mon accord pour que ces prélèvements et/ou leurs dérivés, non utilisés pour cette étude et anonymisés, puissent être mis à la disposition de la communauté scientifique à des fins de recherche biomédicale à la fin de l'étude. Je serai informé des recherches envisagées.

Je m'oppose à ce que ces prélèvements et/ou leurs dérivés, non utilisés pour cette étude et anonymisés, puissent être mis à la disposition de la communauté scientifique à des fins de recherche biomédicale à la fin de l'étude.

Nom du patient :

Date :

Signature :

Nom de l'investigateur :

Date :

Signature :

ANNEXE IV : PROCEDURES

Précautions préalables obligatoires

- Vérification sérologique HIV, HVC, HVB et coagulation datant de moins de 6 mois (prévue dans le parcours de soin classique)
- Informer le patient (lettre d'information et consentement éclairé écrit)

Les biopsies

- sont réalisées **dans des conditions de stérilité strictes**. La peau doit être nettoyée à la chlorhexidine ou l'alcool, à l'exclusion de tout autre antiseptique.
- de préférence à l'aide d'un **dermatome** (ou « punch », 2 mm), au niveau cutané
- ou par découpe au scalpel lame 23 d'un fragment isolé à l'aide d'une pince courbe « **passer-fil de Redon** », stérile, de dimensions : 2 à 3 mm de long sur 2 mm de large et 3 mm de profondeur.

Conditionnement des biopsies

- Immédiatement après le prélèvement, les fragments biopsiques (peau, péritumoral, tumoral) sont placés SEPARÉMENT dans des tubes ou poudriers stériles annotés (flacons ECBU à bouchon rouge) dans du **NaCl 9% injectable** à température ambiante ; **transportés** dès que possible dans des conditions assurant la protection contre les chocs mécaniques et thermiques (protection par plastique à bulles et emballage résistant).
- Prélever le sang (4 mL) sur tube EDTA (bouchon violet)

L'expédition doit être immédiate et permettre la **livraison** des prélèvements dans un délai maximal de **48 heures** dans les conditions de transport de matériel biologique. Le transport s'effectue à température ambiante.

- **Contactez les laboratoires lorsque la chirurgie est planifiée pour convenir d'une date de réception.**
- S'arranger pour organiser l'envoi au moins avant le jeudi de la semaine pour éviter tout problème de réception (prévoir 48h au grand maximum pour le trajet du colis).
- Placer les flacons (chaque flacon + tube de sang) dans deux colis de type "transport de matériel biologique" (selon réglementation) avec les éléments spécifiés dans le tableau suivant
- Sceller les cartons et apposer le bordereau autocollant de retour pré-rempli si fourni.
- Transmettre les paquets au vaguemestre ou à la personne mandatée par chronomédical ou autre transporteur spécial si enlèvement sur demande.
- Adresser à l'adresse EXACTE suivante :

	colis 1: sang et biopsie tumorale	colis 2: biopsies de peau, et de sein
contenu	<ul style="list-style-type: none">• échantillon sanguin et tumoral• sérologies non anonymes < 6 mois• questionnaire clinique• copie du consentement	<ul style="list-style-type: none">• échantillons cutané et péritumoral• sérologies non anonymes < 6 mois• fiche de liaison• bon de commande (acte B1250)
destinataire	Nicolas FORAY CRU 1052 Inserm, Radiobiologie Bât Cheney A; 1er étage Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec 69373 LYON cedex 08	Dr Marie-Thérèse ZABOT Centre de Biotechnologie Cellulaire - Centre de biologie Est 59, Boulevard Pinel 69677 BRON Cedex

IMPORTANT : Prévenir immédiatement après que les biopsies ont été faites et envoyées en laissant un message à : nicolas.foray@inserm.fr, adeline.granzotto@inserm.fr ET florence.ferrand@chu-lyon.fr – tél : 04 26 55 67 94

ANNEXE V : ECHELLE DE TOXICITE CTCAE V4.0

Terminologie CTCAE v4.0	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4	Grade 5
radiodermite	Érythème léger ou desquamation sèche	Érythème modéré à vif; desquamation humide ponctuelle, souvent au niveau des plis; œdème modéré	Desquamation humide étendue en dehors des zones de plis; saignement provoqué par un traumatisme mineur ou à l'abrasion	nécrose de la peau, ulcération du derme sur toute son épaisseur; saignements spontanés; greffe de peau indiquée ; risque vital	décès
Atrophie du sein	Asymétrie/atrophie minime	Asymétrie/atrophie modérée	Asymétrie >1/3 du volume mammaire; atrophie sévère	-	-
Douleur du sein	Douleur légère	Douleur modérée limitant les activités instrumentales de la vie quotidienne	Douleur sévère; limitant l'autonomie	-	-
hyperpigmentation	Hyperpigmentation couvrant <10% de la surface corporelle; pas d'impact psychosocial	Hyperpigmentation couvrant >10% de la surface corporelle; impact psychosocial	-	-	-
Ulcération cutanée	Superficie totale des ulcères <1 cm, érythème de la peau par ailleurs intacte avec chaleur associée ou œdème	Superficie totale des ulcères 1 - 2 cm; perte de substance partielle impliquant la peau ou la graisse sous-cutanée	Superficie totale des ulcères >2 cm; perte de substance sur toute l'épaisseur entraînant une nécrose des tissus sous-cutanés pouvant exposer le fascia	ulcération de toute taille avec dommages extensifs tels que nécrose des tissus de soutien, du muscle, de l'os avec ou sans perte de substance sur toute l'épaisseur de la peau	décès
Fibrose	Induration légère, possibilité de faire glisser la peau sur les tissus sous cutanés et de la pincer	Induration modérée, possibilité de faire glisser la peau sur les tissus sous cutanés, impossibilité de pincer, limitation des activités instrumentales de la vie quotidienne	induration sévère, impossibilité de faire glisser la peau sur les tissus sous cutanés ou de la pincer, limitation des mouvements articulaires, impact sur l'autonomie	Fibrose généralisée; risque vital par retentissement sur les fonctions respiratoire ou d'alimentation	décès
Télangiectasies	Télangiectasies couvrant <10% de la surface corporelle	Télangiectasies couvrant >10% de la surface corporelle; impact psychosocial	-	-	-
Fibrose pulmonaire	Hypoxémie légère; fibrose pulmonaire radiologique <25% du volume pulmonaire	Hypoxémie modérée ; hypertension artérielle pulmonaire objective; fibrose pulmonaire radiologique : 25 à 50% du volume pulmonaire	Hypoxémie sévère; défaillance cardiaque droite objective; fibrose pulmonaire radiologique > 50 - 75% du volume pulmonaire	Risque vital (complications hémodynamiques / pulmonaires), intubation et assistance ventilatoire; fibrose pulmonaire radiologique > 75% avec destruction alvéolaire majeure	décès
pneumopathie	Asymptomatique; découverte clinique ou radiologique fortuite;	Symptomatique; traitement indiqué, limitation des activités instrumentales de la vie quotidienne	Symptômes sévères; impact sur l'autonomie; oxygénothérapie requise	Risque vital; traitement en urgence (par exemple, trachéotomie, intubation, assistance ventilatoire)	décès



CONFIDENTIEL

Protocole : EVIRaS
RCB : 2012-A00318-35

Oesophagite Dysphagie	Symptomatique, alimentation normale	Symptomatique, alimentation/ déglutition altérée	alimentation/ déglutition sévèrement altérée ; indication de SNG et hospitalisation	Risque vital, traitement en urgence	décès
--------------------------	---	--	--	--	-------

ANNEXE VI: MONOGRAPHIE: LA PROTEINE ATM

Description et distribution :

La protéine ATM possède 3056 acides aminés pour un poids de 350 kD. ATM fait partie de la superfamille des PI-3-kinases, possédant un domaine catalytique conservé similaire à la PI-3-kinase à son extrémité carboxy-terminale, tout comme ATR et DNA-PK qui font partie du même sous-groupe. ATM est une sérine thréonine kinase détectable dans tous les tissus, mais plus fortement au niveau de la rate, du thymus, des testicules et des cellules de Purkinje. Son expression est nucléaire chez les fibroblastes, les lymphocytes et les cellules gonadiques tandis qu'elle est plutôt localisée dans le cytoplasme chez les cellules de Purkinje et les cellules endothéliales.

La protéine ATM est activée suite à une CDB dans l'ADN. Lorsque ce type de cassure survient dans l'ADN, le complexe MRN (Mre11/Rad50/Nbs1) est recruté au site d'ADN endommagé et recrute à son tour la protéine ATM. Celle-ci, présente normalement dans la cellule sous forme de dimère inactif, s'auto phosphoryle au niveau de la sérine 1981, entraînant une dédimérisation et une activation d'ATM. Elle phosphoryle ensuite H2AX, une variante de la famille des histones, qui recrute au site d'ADN endommagé plusieurs protéines qui sont subséquemment phosphorylées par ATM, dont 53BP1, BRCA1, Chk1 et Chk2.

Ces substrats d'ATM vont ensuite induire l'arrêt du cycle cellulaire et l'activation des points de contrôle, deux processus qui vont permettre la réparation de l'ADN endommagé. Si l'ADN est irréparable, des processus d'apoptose ATM-dépendants vont se mettre en branle pour éviter que la cellule survive. Dans les cellules endothéliales et cellules de Purkinje du cervelet, ATM va activer des voies de survies comme celle du NF- κ B pour éviter que la cellule entre en apoptose trop rapidement.

Fonctions :

- ATM permet de réparer les cassures double-brins dans l'ADN survenant lors d'une agression physique tel des radiations ionisantes via l'activation de deux mécanismes : la recombinaison homologue entre deux chromatides sœurs d'ADN et la suture non homologue des brins brisés (NHEJ). Ces mécanismes sont induits par l'activation de plusieurs substrats d'ATM : Chk1 et Chk2 activant les points de contrôle du cycle cellulaire, c-Abl activant le processus de recombinaison homologue, BRCA1, qui est impliqué dans la réparation d'ADN et p53, un facteur de transcription activant des gènes de réparation d'ADN, d'arrêt du cycle cellulaire et d'apoptose.
- ATM est impliquée dans la méiose car elle répare les cassures double brin dans l'ADN survenant lors de la recombinaison homologue au cours de la méiose I. Elle agit également dans le maintien et l'auto renouvellement des cellules souches germinales dans les tubules séminifères des testicules. ATM est aussi importante au niveau du système immunitaire car elle répare les cassures double-brins survenant lors de la recombinaison V(D)J. Cette dernière est en fait un réarrangement du génome des lymphocytes B et T immatures qui permet de produire un clone lymphocytaire unique.
- Au niveau des cellules de Purkinje du cervelet, la protéine ATM aurait un rôle dans la synthèse d'anti-oxydants luttant contre le stress cellulaire et la neurodégénération.

Mutations :

Une mutation d'un seul allèle dans le gène ATM est un facteur de risque pour le cancer du sein, alors qu'une mutation dans les deux allèles entraîne l'ataxie télangiectasie, ou syndrome de Louis-Bar. Le gène ATM s'étend sur environ 150kb d'ADN génomique sur le locus 11q22-23, contient 66 exons et produit un transcrit épicissé de 13kb.

L'ataxie télangiectasie est une maladie autosomique récessive avec une incidence d'un cas/300 000 naissances. Elle se manifeste par une atteinte neurologique, c'est-à-dire une ataxie cérébelleuse progressive, causée par une dégénérescence des cellules de Purkinje, commençant dès l'âge de deux ans et se manifestant par une mauvaise coordination, des tremblements et troubles d'équilibre. On observe aussi des télangiectasies (éclatement de petits vaisseaux sanguins), une stérilité complète, une radiosensibilité, un déficit immunitaire avec infections respiratoires graves et une susceptibilité accrue aux cancers. Environ 10 à 15% des personnes atteintes d'ataxie-télangiectasie vont développer un lymphome ou une leucémie avant ou pendant l'adolescence.

PREVIRaS

N°ID RCB : 2013-A01100-45

**Etude de la Variabilité inter et intra Individuelle de la
Radiosensibilité des tissus Sains dans le cancer du
sein : étude de faisabilité.**

Version n°1.1 – 20.09.13

INVESTIGATEUR COORDONNATEUR ICL	Dr Guillaume VOGIN Radiothérapeute Institut de Cancérologie de Lorraine 6 avenue de Bourgogne CS 30519 54519 Vandœuvre-les-Nancy
INVESTIGATEUR CO-COORDONNATEUR ICL	Pr Frédéric MARCHAL Chirurgien Institut de Cancérologie de Lorraine 6 avenue de Bourgogne CS 30519 54519 Vandœuvre-les-Nancy
PROMOTEUR	Institut de Cancérologie de Lorraine - ICL 6, avenue de bourgogne CS 30519 54519 Vandœuvre-lès-Nancy, Cedex Tél : 03 83 59 84 00 - Fax : 03 83 44 60 71

AUTORISATION D'ESSAI CLINIQUE DU PROTOCOLE PREVIRaS

Etude de la Variabilité inter et intra Individuelle de la Radiosensibilité des tissus Sains: étude de faisabilité.

AUTORISATION D'ESSAI CLINIQUE	
COMITE DE PROTECTION DES PERSONNES	Date d'avis :
NOM DU CPP : CPP EST III	Réf. CPP :

COMITE DE REDACTION	Dr Guillaume VOGIN, Pr Frédéric MARCHAL, Dr Emmanuel DESANDES, Dr Véronique GILLON, Laurinda FERNANDES
Docteur Desandes METHODOLOGISTE - BIostatisticien	Institut de Cancérologie de Lorraine Département d'Information Hospitalière 6 avenue de Bourgogne CS 30519 - 54519 Vandœuvre-les-Nancy e-mail : e.desandes@nancy.unicancer.fr Tél : 03 83 59 84 70 – Fax : 03 83 59 84 15

COORDONNEES UTILES	
Dr Guillaume VOGIN Investigateur Coordonnateur	Docteur Guillaume VOGIN Département Radiothérapie - Institut de Cancérologie de Lorraine 6, avenue de Bourgogne CS 30519 - 54519 Vandœuvre-lès-Nancy cedex Tel : 03.83.59.84.27 - Fax : 03.83.59.83.91 e-mail : g.vogin@nancy.unicancer.fr
Dr Véronique GILLON RESPONSABLE RECHERCHE CLINIQUE	Docteur Véronique GILLON Institut de Cancérologie de Lorraine 6, avenue de Bourgogne CS 30519 - 54519 Vandœuvre-lès-Nancy cedex Tel : 03.83.59.86.08 - Fax : 03.83.59.83.59 e-mail : v.gillon@nancy.unicancer.fr
Laurinda FERNANDES Chef de Projet	Laurinda FERNANDES Institut de Cancérologie de Lorraine 6, avenue de Bourgogne CS 30519 - 54519 Vandœuvre-lès-Nancy cedex Tel : 03.83.59.84.87 - Fax : 03.83.59.83.59 e-mail : l.fernandes@nancy.unicancer.fr
Inclusion	<i>Les inclusions sont assurées de 8h30 à 17h30 au numéro de fax :</i> Fax : 03 83 59 83 59

1) RESUME

Titre de l'étude	PREVIRaS Etude de la Variabilité inter et intra Individuelle de la Radiosensibilité des tissus Sains dans le cancer du sein : étude de faisabilité.
Promoteur	Institut de Cancérologie de Lorraine - 6, avenue de bourgogne, 54 511 Vandœuvre-lès-Nancy, Cedex
Numéro du projet	2013-A01100-45
Version et date	Version n° 1.1 du 20.09.13
Médecin Coordonnateur	Dr Guillaume VOGIN Radiothérapeute Institut de Cancérologie de Lorraine avenue de bourgogne CS 30519 54 511 Vandœuvre-lès-Nancy, Cedex Email : g.vogin@nancy.unicancer.fr
Co-coordonnateur	Pr Frédéric MARCHAL Institut de Cancérologie de Lorraine Chirurgien avenue de bourgogne CS 30519 54 511 Vandœuvre-lès-Nancy, Cedex Email : f.marchal@nancy.unicancer.fr
Type d'étude	Il s'agit d'une étude de faisabilité monocentrique française interventionnelle à risque minime. Cette étude de faisabilité aura pour objectif de : <ul style="list-style-type: none"> - Décrire sur le plan moléculaire le concept de variabilité de radiosensibilité intertissulaire observée en clinique en intercomparant 5 types cellulaires du microenvironnement mammaire au moyen de 4 biomarqueurs - étudier le processus global du prélèvement et de son analyse (coût, acheminement du prélèvement, délai de réponse) avant de débiter l'étude princeps EVIRAS enregistrée sous le N°A0031835 version 1.1 du 24/04/12, CPP Est III. EVIRAS est destinée à étudier les variations intra et inter individuelles de potentiels biomarqueurs de

	<p>radiosensibilité des tissus sains chez des patientes devant bénéficier de radiothérapie postopératoire à l'encontre d'adénocarcinomes mammaires infiltrants ou in situ. La présente étude de faisabilité ne testera que 4 biomarqueurs tels que détaillés ci-dessous.</p> <p>PREVIRaS vise ainsi à discriminer parmi les tissus prélevés et les biomarqueurs testés ceux qui sont les plus pertinents au vu des objectifs de l'étude princeps qui se poursuivra chez 28 patientes au total en adaptant les tissus prélevés et les biomarqueurs dosés aux résultats préliminaires de l'étude de faisabilité.</p>
Objectifs de l'étude	<p><u>Objectif principal :</u></p> <p>Décrire sur le plan moléculaire le concept de variabilité de radiosensibilité intertissulaire observée en clinique en intercomparant 5 types cellulaires du microenvironnement mammaire au moyen de 4 biomarqueurs</p> <p><u>Objectif secondaire :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - étudier le processus global du prélèvement et de son analyse (coût, acheminement du prélèvement, délai de réponse)
Critère de jugement principal	<p>Nous mesurerons pour chaque type cellulaire et chaque patiente le nombre moyen (et écart type) de foci γH2AX résiduels à 24h dans les noyaux des cellules d'intérêt. Ce paramètre détermine la radiosensibilité du tissu d'intérêt. 3 autres biomarqueurs seront mesurés :</p> <ul style="list-style-type: none"> - nombre moyen (et écart type) de foci pATM à 10 min dans les noyaux des cellules d'intérêt. -concentration noyau/cytoplasme de pATM, évaluée par western blot -intensité de l'activité kinase (quantité de fluorescence émise) mesurée par immunoprécipitation
Méthodologie	<p>Cette étude de faisabilité sera réalisée chez 5 patientes. Les 3 biopsies (tumeur, tissus sain et périphérie tumorale) et le prélèvement sanguin seront effectués chez les 5 patientes. Les 4 biomarqueurs seront mesurés pour chaque prélèvement.</p> <p>Les patientes doivent être recrutées lors d'une consultation</p>

	<p>spécialisée dans le département de chirurgie à Institut de Cancérologie de Lorraine en vue d'une chirurgie carcinologique pour cancer du sein, puis inclus par le médecin investigateur selon les critères d'éligibilité.</p> <p>Avant l'inclusion, le médecin :</p> <ul style="list-style-type: none"> • explique à la patiente l'étude, • remet à la patiente la note d'information et le consentement, afin d'obtenir son accord de participation <p>Au moment de la visite d'inclusion, l'investigateur recueille le consentement de la patiente, procède à un examen clinique et relève les données individuelles de la patiente.</p>
<p>Nombre de patientes</p>	<p>5 patientes seront recrutées dans un premier temps et bénéficieront de la totalité des prélèvements.</p>
<p>Critères d'éligibilité des patientes</p>	<p>Critères d'inclusion :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Age: 18 à 70 ans. 2. Adénocarcinome mammaire infiltrant ou in situ histologiquement documenté 3. tumeur non métastatique 4. tumeur non multifocale, non inflammatoire, PEV (poussée évolutive) 0 ou 1, ≤ 3 cm et N0 5. indication de chirurgie conservatrice 6. indication de RT post-opératoire en fractionnement classique 7. Irradiation à l'Institut de Cancérologie de Lorraine 8. OMS 0 ou 1 9. Affiliation à la sécurité sociale 10. Consentement éclairé signé <p>Critères de non inclusion :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. antécédent de radiothérapie 2. chimiothérapie néo-adjuvante 3. hormonothérapie néo-adjuvante 4. Tumeur avec surexpression de HER2+++ 5. patiente triple négative

	<p>6. diabète, maladie auto-immune, maladie génétique connue</p> <p>7. tabagisme actif en cours</p> <p>8. tout traitement de fond (effet radiosensibilisant ou radioprotecteur possible)</p>
Déroulement de l'étude	<p>Après consentement écrit de la patiente, divers échantillons seront prélevés :</p> <p>1. Lors de la chirurgie programmée, sous anesthésie générale :</p> <ul style="list-style-type: none"> - une biopsie de tumeur prélevée sur la pièce opératoire - une biopsie de tissu péri tumoral (glande mammaire saine par exemple de laquelle nous isolerons les cellules épithéliales et les fibroblastes) en marge de la pièce opératoire - une biopsie de peau – sur la pièce opératoire au niveau de la voie d'abord classique en regard du site tumoral de l'incision et n'en modifiant pas la taille ni la forme <p>2. Lors du bilan sanguin préopératoire programmé :</p> <ul style="list-style-type: none"> - un échantillon sanguin duquel nous isolerons les lymphocytes.
Statistiques	<p>Concernant l'objectif principal, les statistiques seront purement descriptives avec le calcul de la moyenne et l'écart type, la médiane et les extrêmes pour chaque biomarqueur dans chaque prélèvement.</p> <p>Pour l'objectif secondaire, on calculera les délais d'acheminement et d'analyse des différents prélèvements, le coût réel de l'analyse de chaque prélèvement par rapport au coût estimé (900 €/patient pour un prélèvement).</p>
Calendrier	<p>L'étude se déroulera sur une période de 12 mois comprenant une période de recrutement des patientes de 5 mois et une période de suivi de 6 mois.</p> <p>Le début de l'étude, correspondant à la première inclusion.</p> <p>La date de fin de l'étude est définie comme étant la dernière visite de la dernière patiente incluse dans l'étude. Elle est prévue pour fin septembre 2014.</p>

Institut de Cancérologie de Lorraine

CENTRE REGIONAL DE LUTTE CONTRE LE CANCER

Protocole :

N° ID RCB :

ARPEGE : Analyse de la Radiosensibilité individuelle en oncologie PÉdiatrique dans l'interrégion Grand-Est

Version n° 21 du 17/10/2013

INVESTIGATEUR COORDONNATEUR	Dr Valérie BERNIER-CHASTAGNER Radiothérapeute Institut de Cancérologie de Lorraine avenue de bourgogne CS 30519 54 511 Vandœuvre-lès-Nancy, Cedex Email : v.bernier@nancy.unicancer.fr
INVESTIGATEUR CO- COORDONNATEUR	Dr Guillaume VOGIN Radiothérapeute Institut de Cancérologie de Lorraine avenue de bourgogne CS 30519 54 511 Vandœuvre-lès-Nancy, Cedex Email : g.vogin@nancy.unicancer.fr
PROMOTEUR	Institut de Cancérologie de Lorraine 6, avenue de bourgogne 54 511 Vandœuvre-lès-Nancy, Cedex

Sommaire

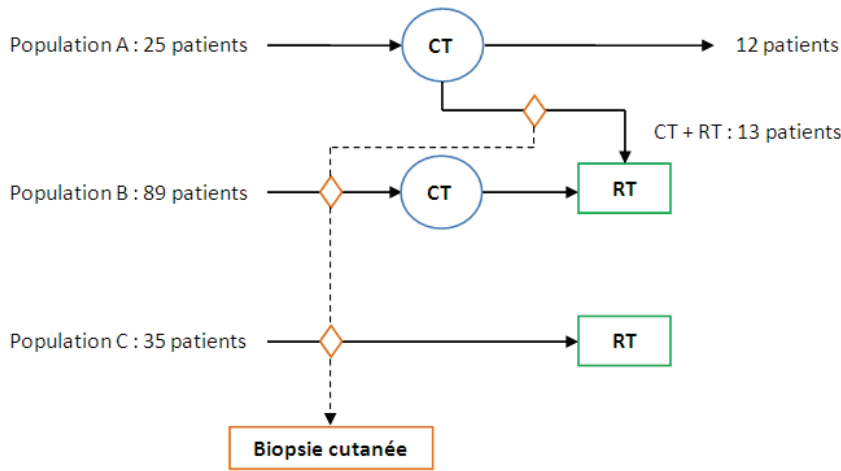
1) Résumé	5
2) Justification de l'essai.....	10
3) Problématique.....	10
4) Objectifs.....	13
a) Objectif principal	13
b) Objectifs secondaires.....	13
5) Bénéfices et risques pour les personnes se prêtant à la recherche.....	14
a) Bénéfices	14
b) Risques	14
c) Balance bénéfices / risques	14
6) Critères d'évaluation	15
a) Critère principal	15
b) Critères secondaires	15
7) Population de l'étude	15
a) Description de la population à l'étude.....	15
b) Source de recrutement	16
c) Critères de sélection.....	16
1. Critères d'inclusion	16
2. Critères de non-inclusion	16
8) Vigilance	16
a) Définition	16
1. Définition Générale	16
2. Définition d'un événement indésirable grave attendu (EIG-A).....	17
3. Définition d'un événement indésirable grave inattendu (EIG-I)	17
4. Critère d'intensité	17
5. Conduite à tenir en cas d'événement indésirable grave	18
6. Suivi des EIG	18
7. Rapport annuel de sécurité (RAS).....	19
b) Conduite à tenir en cas d'événement non graves	19
c) Conduite à tenir en cas d'événement indésirable : faits nouveaux	19
9) Conception de la recherche.....	19
a) Définition et durée de l'étude	19

b)	Inclusion des patients.....	20
1.	Bilan d'inclusion.....	20
2.	Réalisation de la biopsie	20
3.	Bilans de suivi.....	20
4.	Surveillance	21
5.	Tableau récapitulatif du déroulement de l'essai	22
c)	Déroulement de l'étude	23
1.	Prélèvements chez l'enfant	23
2.	Culture cellulaire	23
3.	Irradiation des échantillons.....	23
4.	Réalisation des tests	23
5.	Recueil des données cliniques	24
d)	Logistique générale de la recherche.....	24
10)	Sortie d'étude	25
11)	Description des données collectées	25
a)	Description des données recueillies	25
a)	Collection d'échantillon d'origine biologique	26
1.	Nature des échantillons.....	26
2.	Conditions de prélèvement.....	26
3.	Modalités de codage et d'étiquetage	26
4.	Modalités de traitement des échantillons	26
5.	Conditions de transport.....	26
6.	Modalités de stockage.....	26
7.	Modalités de gestion des échantillons	26
8.	Gestion informatique des données relatives aux échantillons	26
9.	Conditions de traçabilité.....	26
12)	Analyse statistique	27
a)	Nombre de sujet nécessaire	27
1.	Justification	27
2.	Faisabilité	27
b)	Analyse statistique.....	27
1.	Responsable de l'analyse statistique	27
2.	Calcul d'effectif	28
3.	Description du plan d'analyse statistique	28
c)	Contrôle et assurance qualité des données.....	28

1. Centralisation des données	29
2. Recueil, suivi, traitement et conservation des données	29
d) Aspects réglementaires	30
1. Responsabilités du promoteur	30
2. Responsabilités des investigateurs	30
3. Information et consentement des participants	31
4. Comité de protection des personnes - Autorité compétente - CNIL	31
5. Assurance	31
e) Amendements au protocole	31
f) Confidentialité des sujets	32
g) Propriétés des données	32
13) Règles de publication	32
14) Références bibliographiques	33

1) Résumé

Titre de l'étude	ARPEGE : Analyse de la Radiosensibilité individuelle en oncologie Pédiatrique dans l'interrégion Grand-Est
Promoteur	Institut de Cancérologie de Lorraine 6, avenue de bourgogne, 54 511 Vandœuvre-lès-Nancy, Cedex
Médecin coordinateur	Dr Guillaume VOGIN Radiothérapeute Institut de Cancérologie de Lorraine avenue de bourgogne CS 30519 54 511 Vandœuvre-lès-Nancy, Cedex Email : g.vogin@nancy.unicancer.fr
Objectifs de l'étude	<p><u>Objectif principal</u> :</p> <p>Evaluer le pouvoir prédictif du test d'immunofluorescence indirecte sur fibroblastes dermiques [IFI]) sur la survenue de toxicités aiguës cutanéomuqueuses qualifiées d'inhabituelles chez les enfants et adolescents traités par RT avec ou sans chimiothérapie préalable pour un cancer.</p> <p><u>Objectifs secondaires</u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> • <u>A court terme (première année)</u> : <p>Mettre en évidence des seuils de prédiction de survenue de toxicités aiguës cutanéomuqueuses qualifiées d'inhabituelles à l'aide des résultats du test IFI afin de définir des groupes de radiosensibilité individuelle.</p> <p>Comparer les performances du test IFI au test des micronoyaux (MN) réalisé sans surcoût sur les fibroblastes</p> <p>Description des anomalies moléculaires courantes chez les patients identifiés comme radiosensibles sur le test IFI à l'aide de marqueurs d'IFI complémentaires.</p> <ul style="list-style-type: none"> • <u>A long terme (années 2-15+)</u> : <p>Étudier la corrélation entre les résultats du test IFI et la survenue de tumeurs secondaires chez les enfants et adolescents traités par RT pour un cancer.</p> <p>Étudier la corrélation entre les résultats du test IFI et la survenue de toxicités tardives de grade 3-4 ou de séquelles graves chez les enfants et adolescents traités par RT pour un cancer.</p> <p>Étudier la corrélation entre le degré de sévérité d'une toxicité aiguë et l'apparition d'une toxicité tardive ou d'une séquelle grave (incluant les tumeurs secondaires).</p>

	Mettre en évidence des seuils de prédiction de survenue de toxicités tardives de grade 3-4 ou de séquelles graves (incluant les tumeurs secondaires) à l'aide des résultats du test IFI afin de définir des groupes de radiosensibilité individuelle.
Design	<p>Schéma global :</p> <p>Après l'annonce d'un cancer dont le traitement local peut comporter une radiothérapie à un enfant/adolescent et à ses parents et après avoir proposé un plan personnalisé de soin, il sera systématiquement proposé de réaliser l'étude de la radiosensibilité selon le schéma suivant :</p>  <pre> graph TD A[Population A : 25 patients] --> CT1((CT)) CT1 --> B[12 patients] CT1 --> C{ } C --> D[CT + RT : 13 patients] B --> D E[Population B : 89 patients] --> F{ } F --> G((CT)) G --> H[RT] I[Population C : 35 patients] --> J{ } J --> K[RT] F -.-> L[Biopsie cutanée] J -.-> L </pre> <p>Le nombre de patients et les sous populations sont détaillés ci-dessous.</p>
Nombre de patients	<p>L'ensemble des enfants et adolescents traités à visée curative pour les tumeurs éligibles dans les départements d'oncologie pédiatrique et de RT de l'axe Rhin-Rhône (Nancy, Strasbourg, Dijon, Besançon, Reims et Lyon) pourront être inclus, ce qui représente environ 150 patients sur une année selon les données de 2011-2012.</p> <p>Au final, environ</p> <ul style="list-style-type: none"> - 25 patients pourraient bénéficier de RT uniquement en cas de réponse insuffisante à la CT néoadjuvante. Cette donnée est connue tardivement.. Seulement la moitié de la population initiale serait irradiée. La biopsie sera donc réalisée juste avant la RT. (population A) - 89 patients pourraient bénéficier de CT néoadjuvante avant la RT (population B) - 35 patients pourraient bénéficier de RT non précédée de CT (population C) <p>Pour les populations B et C, la biopsie sera réalisée au début de la prise en charge.</p> <p>L'objectif principal étant d'évaluer la valeur du test IFI pour prédire le risque de toxicité aigue, le calcul du nombre de sujets nécessaires est basé sur</p>

	<p>l'estimation de l'aire sur la courbe ROC (AUC) Nous souhaitons démontrer que l'AUC est supérieure à 0.7 (=AUC₀). Le calcul est basé sur le test unilatéral : H₀: AUC₁ ≤ AUC₀ vs H_a: AUC₁ > AUC₀. Nous estimons l'AUC observée sera de 0,85 (AUC₁=0,85). En se basant sur 15% de toxicité aiguë et un risque de première espèce à 5%, il faut recruter 157 sujets pour obtenir une puissance supérieure à 0.8 (précisément 0.813). Notons qu'avec 157 patients, un nombre de 24 toxicités aiguës et de 8 toxicités tardives est attendu.</p>
Critères d'éligibilité des patients	<p><u>Critères d'inclusion :</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Enfant ou adolescents < 18 ans 2. Patient ayant au diagnostic une indication théorique de radiothérapie dans le cadre de la stratégie de contrôle local de la tumeur primitive (tumeurs cérébrales, tumeurs d'Ewing, tumeurs mésenchymateuses malignes, neuroblastomes, néphroblastomes, lymphomes de Hodgkin) 3. Irradiation en fractionnement standard (1,8Gy à 2,2Gy/fraction ; 5 fr/semaine), quelles que soient la technique et la particule utilisées (collectés dans le CRF) 4. Patient affilié à un régime de sécurité sociale 5. Patient et/ou parents ou représentant(s) légal(ux) ayant daté et signé un consentement éclairé. <p><u>Critères de non inclusion :</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Contre-indication à la biopsie cutanée 2. Traitement à visée palliative 3. Traitement antérieur par RT dans la même zone (réirradiation) 4. Indication de RT hypofractionnée 5. Suivi du patient impossible
Calendrier	<ul style="list-style-type: none"> • Durée des inclusions : 24 mois Durée de suivi des patients pour l'objectif principal: 3 mois ; 15 ans pour les objectifs secondaires • Durée globale de l'étude : 17 ans • Des analyses intermédiaires seront réalisées ensuite à 5 ans et 10 ans pour les objectifs secondaires.
Type d'étude	Il s'agit d'une étude prospective multicentrique.

Méthodologie	<p><u>Prélèvements chez l'enfant :</u></p> <p>Ils seront réalisés après avoir obtenu la signature du consentement éclairé de la part des deux parents et de l'enfant en fonction de son âge. La biopsie de peau (2 mm² prélevés au niveau de la fesse) sera réalisée par l'oncopédiatre ou le radiothérapeute référent du patient.</p> <p>Les prélèvements doivent être adressés à l'état frais, anonymisés, et dans les 48 heures à l'Institut de Cancérologie de Lorraine.</p> <p><u>Culture cellulaire :</u></p> <p>La biopsie de peau sera mise en culture afin d'obtenir une lignée fibroblastique non-transformée propre au patient qui sera en outre conservée avec l'autorisation du patient et/ou de ses représentants légaux.</p> <p><u>Irradiation des échantillons :</u></p> <p>Acheminés à température ambiante au CRCL de Lyon, les fibroblastes du patient sont ensemencés sur des lamelles stériles 2 jours avant l'irradiation. Une dose unique de 2 Gy est délivrée dans le département de RT du Centre Léon Bérard (Lyon).</p> <p><u>Réalisation du test :</u></p> <p>Les cellules irradiées et témoins sont fixées à des temps stratégiques (10 min, 1 heure, 4 heures et 24 heures) puis hybridées par les anticorps primaires dirigés contre les protéines d'intérêt : H2AX, MRE11 et ATM.</p> <p>L'activité kinase nucléaire de la protéine pATM sera évaluée à 10 min et 1h après irradiation afin d'en rechercher la valeur maximale et le point de temps correspondant.</p> <p>Les lames seront analysées sur microscope à fluorescence. L'ensemble des résultats permettra de classer les patients en groupes de radiosensibilité individuelle.</p> <p>En fonction des résultats observés d'autres marqueurs de signalisation de la réparation seront testés par la même méthode (objectif secondaire spécifique au test IFI)</p> <p><u>Recueil des données cliniques :</u></p> <p>Les patients seront suivis de manière hebdomadaire durant toute la durée de la RT, puis selon les recommandations de suivi propre à leur pathologie.</p> <p>Les toxicités aiguës seront rapportées une fois par semaine pendant la RT jusqu'à leur disparition et cotées selon l'échelle NCI-CTACE v4.0. (http://www.cepd.fr/CUSTOM/CEPD_toxicite.pdf)</p> <p>Les effets tardifs, y compris les seconds cancers, seront recherchés et reportés au cours de consultations annuelles systématiques auprès de l'oncopédiatre ou du radiothérapeute et selon la même échelle NCI-CTACE v4.0. L'insertion scolaire et professionnelle sera également recueillie.</p>
--------------	---

En parallèle, la dose délivrée aux organes à risque sera systématiquement recueillie sur la dosimétrie prévisionnelle ainsi que les données cliniques (éventuelles toxicités tardives) dans le cadre de la mise en place d'une base de données nationale (HOPE-pediaRT).

Aucun examen spécifique ne sera demandé au cours du suivi dans le cadre de cette étude.

Statistiques

Analyse de l'objectif principal :

La courbe ROC du test IFI sera décrite. Le test de l'hypothèse $H_0: AUC \leq 0,7$ contre $H_a: AUC > 0,7$ sera effectué. L'aire sous la courbe ROC ainsi que son intervalle de confiance à 95% seront calculés.

2) Justification de l'essai

Chaque année environ 2400 nouveaux cas de cancers de l'enfant (0-14 ans) et l'adolescent (15-19 ans) sont recensés en France, avec un âge moyen au diagnostic de 5 ans.[1, 2] Bien que la plupart des protocoles thérapeutiques tentent actuellement de limiter l'emploi de la radiothérapie (RT) dans cette population, elle reste incontournable pour le traitement curatif des tumeurs cérébrales, lymphomes de Hodgkin, leucémies aiguës, sarcomes d'Ewing et des tissus mous, neuroblastomes, néphroblastomes ou rétinoblastomes de haut risque. Environ 900 enfants et adolescents sont traités par RT chaque année en France.[3]

Leur traitement débute le plus souvent par une chimiothérapie néoadjuvante suivie, pour les tumeurs solides, par la chirurgie et/ou la RT.

L'espérance de vie pour les 80 % des enfants/adolescents susceptibles de guérir est longue, et l'incidence des complications post radiques aiguës et surtout tardives, proportionnelle à la dose délivrée pourrait dépasser celle de l'adulte. Dix à 15% des patients sont exposés à une toxicité aiguë inhabituelle obligeant le praticien à limiter voire à arrêter le traitement.[4]

Sont qualifiées d'inhabituelles les toxicités aiguës :

- de grade 2 ou plus survenant à des doses faibles (1^{ère} semaine de traitement)
- de grade 3-4 durant plus de 4 semaines après la fin de RT et/ou nécessitant une intervention chirurgicale.[5]

Par ailleurs, 3 à 5% des enfants et adolescents sont susceptibles de développer une **toxicité tardive pouvant entraîner des séquelles parfois létales et avec un impact socio-économique majeur (troubles de scolarité, mobilisation des parents, difficultés d'insertion professionnelle, hospitalisations et traitements symptomatiques coûteux, paupérisation...)** Cette toxicité tardive est qualifiée de sévère lorsque son intensité atteint un grade 3-4 et qu'elle survient ou persiste plus de 90 jours après la fin de la RT. [5] Chez l'adulte, cette dernière peut être consécutive à une toxicité aiguë inhabituelle.[6, 7] Il est donc primordial de suivre au long cours ces patients

Parallèlement à des taux de guérison élevés dans cette population, apparaissent des cancers radio-induits de distribution probabiliste, mais dont l'incidence augmente avec la dose délivrée et la durée du suivi.[8, 9] En dehors de cette dernière complication, les toxicités déterministes sont largement attribuables à des variations inter individuelles et constitutionnelles de la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN.[10, 11]

3) Problématique

Chez l'adulte, la distribution de la radiosensibilité des individus suit une courbe gaussienne [12]; La toxicité observée chez 5% des individus les plus radiosensibles est à l'origine des abaques de recommandations de dose maximale tolérée à appliquer à aux organes à risque et chez tout patient en pratique quotidienne. [13] **La radiosensibilité (RS) des tissus sains**

de l'enfant et de l'adolescent est inconnue à ce jour, avec probablement de grandes variabilités en fonction de l'âge si l'on considère l'ensemble des modifications des fonctions métaboliques tout au long de la croissance.

Seuls de très rares cas d'enfants ont été étudiés quant à leur radiosensibilité.[10, 14] Actuellement, et du fait de l'absence de test prédictif fiable de la toxicité radiative, **il n'existe pas, en pratique courante, d'adaptation personnalisée de la dose délivrée et/ou de son étalement/fractionnement.**

Les tests prédictifs de la toxicité de la RT se heurtent à un manque d'universalité, de reproductibilité et de spécificité, ainsi qu'à une certaine chronophagie pour la plupart. Ces tests sont également souvent réalisés sur des modèles cellulaires éloignés de la physiopathologie de ces toxicités (en particulier sur le sang), irradiés à des doses non pertinentes sur le plan clinique car créant des lésions élémentaires différentes en termes de quantité et qualité.[15] En particulier le test d'apoptose lymphocytaire [16] a conduit à des résultats artéfactuels [17] et n'est pas implémenté en pratique quotidienne. Curieusement les patients réputés les plus radiosensibles ont un taux d'apoptose radio-induite minimal. Or les patients porteurs du syndrome de Li Fraumeni (inactivation de P53) ne sont pas radiosensibles.

En 2003 la technique d'immunofluorescence indirecte (IFI) appliquée à l'étude de la fonctionnalité de la réparation a révolutionné la recherche en radiobiologie en permettant la détection des cassures double-brins (CDB) dans les noyaux cellulaires avec une résolution inégalée et pour une gamme de dose variant de 1 mGy à 10 Gy.[18] Cette technique a objectivé que les CDB non réparées sont les dommages les mieux corrélés à la radiosensibilité cellulaire.[19]

L'équipe INSERM CRU 1052 a proposé un modèle général de réparation des CDB autour de 3 protéines d'intérêt (pH2AX et ATM pour les deux principales voies de réparation des CDB, MRE11 pour l'instabilité génomique) à partir d'un large spectre de lignées humaines radiosensibles issues de patients ayant présenté une toxicité inhabituelle à la radiothérapie ou touchés par une maladie congénitale de la réparation (Figure 1). L'équipe INSERM CRU 1052 réalise en routine ses analyses sur des lignées primaires fibroblastiques (cellules au centre de la fibrose radio-induite) non transformées issues d'une biopsie de peau de patient. Après irradiation ex vivo à une dose unique de 2 Gy (dose classique délivrée chaque jour en routine) une cinétique des protéines d'intérêt marquées en IFI est réalisée [20, 21]. Ces protéines migrent et s'agrègent dans le noyau après irradiation. Le nombre de foci formés est équivalent à celui des CDB. Un test a donc été développé et sera évalué sur la cohorte ARPEGE.

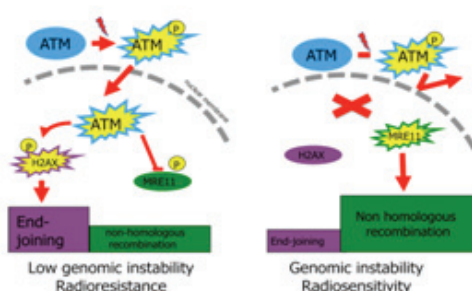


Figure 1 : Modèle développé autour des 3 protéines d'intérêt

Afin de prédire la radiosensibilité humaine en comparant les tests les plus couramment utilisés sur une collection de lignées humaines diversement radiosensibles [20], l'équipe INSERM CRU 1052 a mis en évidence :

- 1) Une corrélation quantitative et continue entre la fraction de survie clonogénique à 2 Gy¹ et le nombre de CDB non réparées à 24h dont pH2AX est un marqueur fiable [14]
- 2) L'existence d'une nouvelle voie de réparation des CDB (dépendant de la protéine MRE11) active dans les tissus quiescents et dont la perte de contrôle peut expliquer l'instabilité génomique de certains patients;
- 3) Le transit nucléo-cytoplasmique de la protéine ATM pour activer la voie de réparation par suture (NHEJ) et pour inhiber la voie MRE11.[27]

Il a été ainsi proposé chez l'adulte une classification de la radiosensibilité humaine permettant de répartir les patients entre trois groupes (Figure 2) selon le nombre de CDB non réparées à 24h[21]:

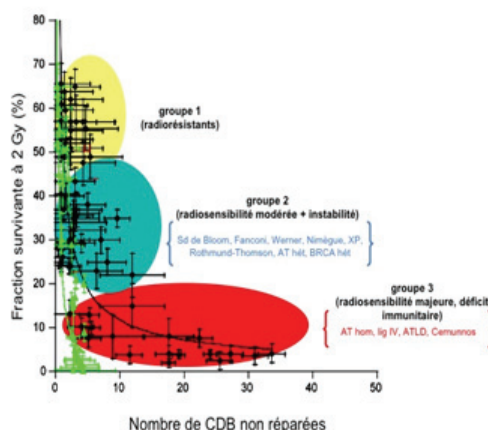


Figure 2 : Groupes de radiosensibilité individuelle proposés par l'équipe Inserm CRU 1052

- Groupe I : Patients radiorésistants ($SF_2 > 45\%$) tolérant la RT ; le nombre de CDB résiduelles à 24h est négligeable.
- Groupe II : Patients présentant une RS modérée mais significative ($7 < SF_2 \leq 45\%$) et une instabilité génomique. Le nombre de CDB résiduelles à 24h est augmenté. A chaque nouvelle irradiation, les cellules accumulent les dommages non réparés jusqu'à survenue d'effets cliniquement appréhendables, sensiblement plus précoces et/ou sévères.

¹ Gold standard à partir duquel le concept de radiosensibilité cellulaire a été défini. 28. Fertil B, Malaise EP. Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1981 May;7(5):621-9. La radiosensibilité cellulaire est liée à la réponse clinique des tumeurs 29. West CM, Davidson SE, Roberts SA, Hunter RD. Intrinsic radiosensitivity and prediction of patient response to radiotherapy for carcinoma of the cervix. *British journal of cancer.* 1993 Oct;68(4):819-23. et des tissus sains. 30. Burnet NG, Nyman J, Turesson I, Wurm R, Yarnold JR, Peacock JH. Prediction of normal-tissue tolerance to radiotherapy from in-vitro cellular radiation sensitivity. *Lancet.* 1992 Jun 27;339(8809):1570-1.

- Groupe III (situation exceptionnelles) : Patients présentant des mutations homozygotes des protéines de réparation ; il existe pour ces sujets une hyperradiosensibilité majeure ($SF2 \leq 7\%$) et un risque élevé de complications sévères. Le nombre de CDB résiduelles à 24h est maximal.

Une étude rétrospective réalisée sur les lignées fibroblastiques primaires de 100 patients adultes ayant présenté des toxicités tardives diverses indique qu'il existe une corrélation statistiquement significative entre groupe de radiosensibilité cellulaire et sévérité de la réaction (grade CTCAE v4.0) (Vogin G et al., soumis).

Notre démarche s'inscrit dans la dynamique de création d'une véritable base de données nationale permettant un suivi sur le long terme des patients traités par RT dans l'enfance.[22]

Il s'agit à terme de délivrer un traitement local personnalisé à la radiosensibilité individuelle des patients, dépistée systématiquement au début de la prise en charge. Des études cliniques d'adaptation de la dose à ce statut seront réalisées dans un deuxième temps.

4) Objectifs

a) Objectif principal

Evaluer le pouvoir prédictif du test d'immunofluorescence indirecte sur fibroblastes dermiques [IFI] sur la survenue de toxicités aiguës cutanéomuqueuses qualifiées d'inhabituelles chez les enfants et adolescents traités par RT avec ou sans chimiothérapie préalable pour un cancer.

b) Objectifs secondaires

- A court terme (première année) :

Mettre en évidence des seuils de prédiction de survenue de toxicités aiguës cutanéomuqueuses qualifiées d'inhabituelles à l'aide des résultats du test IFI afin de définir des groupes de radiosensibilité individuelle.

Comparer les performances du test IFI au test des micronoyaux (MN) réalisé sans surcoût sur les fibroblastes

Description des anomalies moléculaires courantes chez les patients identifiés comme radiosensibles sur le test IFI à l'aide de marqueurs d'IFI complémentaires.

- A long terme (années 2-15+) :

Étudier la corrélation entre les résultats du test IFI et la survenue de tumeurs secondaires chez les enfants et adolescents traités par RT pour un cancer.

Étudier la corrélation entre les résultats du test IFI et la survenue de toxicités tardives de grade 3-4 ou de séquelles graves chez les enfants et adolescents traités par RT pour un cancer.

Étudier la corrélation entre le degré de sévérité d'une toxicité aiguë et l'apparition d'une toxicité tardive ou d'une séquelle grave (incluant les tumeurs secondaires).

Mettre en évidence des seuils de prédiction de survenue de toxicités tardives de grade 3-4 ou de séquelles graves (incluant les tumeurs secondaires) à l'aide des résultats du test IFI afin de définir des groupes de radiosensibilité individuelle.

5) Bénéfices et risques pour les personnes se prêtant à la recherche

a) Bénéfices

Le bénéfice attendu de cette recherche est un bénéfice collectif avec une amélioration des connaissances sur la distribution de la radiosensibilité dans la population pédiatrique. Une optimisation des traitements pourrait être envisagée dans les études ultérieures chez les patients dépistés radiohypersensibles. Il pourrait par ailleurs exister un bénéfice sociétal (psychologique, économique..) par la réduction de la fréquence et de la gravité des séquelles attendues.

b) Risques

⇒ Risques et contraintes physiques

Les biopsies de peau sont un acte sans danger, réalisées sous anesthésie et ne laissant qu'une minime cicatrice visible, de la taille du cylindre utilisé pour la biopsie (2mm). Le risque d'infection locale et de saignement est faible et facilement contrôlé par des mesures locales simples. Enfin, il est possible de constater une réaction allergique locale et banale au pansement adhésif. A plus long terme, certains individus peuvent développer indépendamment de leur cancer une cicatrice excessive appelée chéloïde. Cette cicatrice pouvant être disgracieuse, elle peut être corrigée par des mesures réparatrices généralement simples.

c) Balance bénéfices / risques

Les risques liés à la biopsie sont extrêmement faibles en terme septique, hémorragique et esthétique (2 mm² sur la fesse). Les patients seront ensuite traités selon les recommandations en vigueur pour leur pathologie et indépendamment du résultat du test

6) Critères d'évaluation

a) Critère principal

La radiosensibilité des fibroblastes est étudiée par Immunofluorescence indirecte en comptabilisant le nombre (et écart-type) de CDB résiduelles à 24h (marqueur γ -H2AX) après une dose unique de 2 Gy. En outre des données cinétiques sur l'efficacité du nucléoshuttling de la protéine pATM sont recueillies afin d'affiner la classification de la radiosensibilité individuelle (marqueur pATM).

L'intensité de l'activité kinase de pATM est mesurée après immunoprécipitation au moyen d'un kit commercialisé (quantité de fluorescence émise).

La toxicité aigue survient dans les 3 mois suivant la RT.

La toxicité aigue cutanéomuqueuses inhabituelle est définie par toutes les toxicités cutanéomuqueuses aiguës :

- De grade 2 ou plus survenant à des doses faibles (1^{ère} semaine de traitement) ou
- De grade 3-4 durant plus de 4 semaines après la fin de RT et/ou nécessitant une intervention chirurgicale (1)

Le grade de toxicité aigue est évalué par l'échelle CTCAE 4.0, peau et muqueuses.

b) Critères secondaires

L'instabilité génomique des fibroblastes est étudiée par Immunofluorescence indirecte en comptabilisant le nombre (et écart-type) des sites de recombinaison non homologues (marqueur MRE11) après une dose unique de 2 Gy.

Les anomalies moléculaires sont définies par une concentration ou une localisation anormale d'une protéine impliquée dans une des voies de signalisation/réparation des CDB radio induites de l'ADN, en aval d'ATM et pH2AX. Elles sont également identifiées par immunofluorescence indirecte au moyen d'une batterie d'anticorps spécifiques stockée dans le laboratoire de radiobiologie.

La toxicité tardive survient au-delà de 3 mois suivant la RT. Le grade de toxicité est évalué par l'échelle CTCAE 4.0, pour tous les organes à risque. Elle inclut aussi les cancers radioinduits qui se développent après un intervalle libre dans/en marge du champ de traitement.

Les séquelles sévères sont définies par une intensité de grade 3-4 et une durée d'évolution supérieure à 90 jours

7) Population de l'étude

a) Description de la population à l'étude

L'ensemble des enfants et adolescents traités à visée curative dans les départements d'oncologie pédiatrique et de RT pour des tumeurs cérébrales, des tumeurs d'Ewing, des

tumeurs mésenchymateuses malignes, des neuroblastomes, des néphroblastomes, des lymphomes de Hodgkin et des leucémies.

b) Source de recrutement

L'ensemble des enfants et adolescents traités à visée curative dans les départements d'oncologie pédiatrique et de RT de l'axe Rhin-Rhône (Nancy, Strasbourg, Dijon, Besançon, Reims et Lyon)

ce qui représente environ 150 patients sur une année selon les données de 2011-2012 répartis ainsi :

tumeurs cérébrales : 90 pts/an, tumeurs d'Ewing: 9 pts/an, tumeurs mésenchymateuses malignes: 13 pts/an, neuroblastomes: 10 pts/an, néphroblastomes: 7 pts/an, lymphomes de Hodgkin: 9 pts/an et leucémies : 13 pts/an

c) Critères de sélection

1. Critères d'inclusion

1. Enfant ou adolescents < 18 ans
2. Patient ayant au diagnostic une indication théorique de radiothérapie dans le cadre de la stratégie de contrôle local de la tumeur primitive (tumeurs cérébrales, tumeurs d'Ewing, tumeurs mésenchymateuses malignes, neuroblastomes, néphroblastomes, lymphomes de Hodgkin)
3. Irradiation en fractionnement standard (1,8Gy à 2,2Gy/fraction ; 5 fr/semaine), quelles que soient la technique et la particule utilisées (collectés dans le CRF)
4. Patient affilié à un régime de sécurité sociale
5. Patient et/ou parents ou représentant(s) légal(ux) ayant daté et signé un consentement éclairé.

2. Critères de non-inclusion

1. Contre-indication à la biopsie cutanée
2. Contre-indication à la radiothérapie
3. Radiothérapie à visée palliative
4. Traitement antérieur par RT dans la même zone (réirradiation)
5. Indication de RT hypofractionnée
6. Suivi du patient impossible

8) Vigilance

a) Définition

1. Définition Générale

Est considéré comme un évènement indésirable grave (EIG) tout évènement :

- Entraînant le décès,
- Mettant en jeu le pronostic vital,
- Entraînant une hospitalisation ou une prolongation d'hospitalisation,
- Provoquant une invalidité permanente ou une incapacité temporaire grave,
- Provoquant une anomalie congénitale, une malformation fœtale ou un avortement,
- Médicalement significatif.

Les termes invalidité et incapacité correspondent à tout handicap physique ou psychique temporaire ou permanent, cliniquement significatif et retentissant sur l'activité physique et/ou la qualité de vie du patient.

Est considéré comme médicalement significatif tout événement clinique ou résultat de laboratoire considéré comme grave par l'investigateur et ne correspondant pas aux critères de gravité définis ci-dessus. Ils peuvent faire courir un risque au patient et nécessitent une intervention médicale pour prévenir une issue correspondant à l'un des critères de gravité mentionnés précédemment (exemples : surdosages, seconds cancers, grossesses et faits nouveaux peuvent être considérés comme médicalement significatifs).

N'est pas considéré comme un événement indésirable grave (EIG) :

- Une hospitalisation < à 24 heures,
- Une hospitalisation programmée préalablement au début de l'essai et/ou prévue par le protocole (biopsie, chimiothérapie..).

2. Définition d'un événement indésirable grave attendu (EIG-A)

Dans cette étude, la probabilité d'évènements indésirables graves est extrêmement faible. (Wahie S, Lawrence CM. Wound complications following diagnostic skin biopsies in dermatology inpatients. Arch Dermatol. 2007 Oct;143(10):1267-71.)

Les seuls effets indésirables graves attendus liés à la recherche sont ceux à la réalisation de la biopsie :

- Hémorragie sur le site de biopsie justifiant une transfusion
- Infection cutanée et/ou sous cutanée compliquée de sepsis
- Nécrose cutanée ou cicatrisation inesthétique justifiant une intervention plastique
- Malaise avec perte de connaissance consécutive au geste ou à la douleur imputée

3. Définition d'un événement indésirable grave inattendu (EIG-I)

Un EIG-I est un événement non mentionné ou différent par sa nature, son intensité, son évolution par rapport à la brochure investigateur ou au résumé des caractéristiques du produit (RCP) pour les médicaments ayant une autorisation de mise sur le marché (AMM).

4. Critère d'intensité

Les critères d'intensité sont évalués selon l'échelle de toxicité CTCAE V4.0 (Annexe 6)

5. Conduite à tenir en cas d'événement indésirable grave

L'investigateur informe le promoteur de tous les **Evènements Indésirables Graves Attendus (EIG-A) et inattendus (EIG-I)**, qu'ils soient imputables ou non à la recherche, qui se produisent à partir du jour de la biopsie et sans limitation de délai.

Tous les Événements Indésirables Graves retardés (survenant après cette période de 6 mois) considérés comme raisonnablement liés au(x) traitement(s) protocolaire ou à la recherche doivent être déclarés sans limitation de délai.

La déclaration des EIG se fait par envoi par fax, dans les **48 heures** ouvrées suivant leur constatation,

Cellule de Promotion de l'Institut de Cancérologie de Lorraine
6, avenue de Bourgogne
Tél. : 03 83 59 85 74 – Fax : 03 83 59 83 59
Courriel : I.fernandes@nancy.unicancer.fr

L'investigateur notera pour chaque évènement :

- Sa description aussi clairement que possible selon la terminologie médicale,
- L'intensité,
- La date de début et de fin de l'évènement,
- Les mesures entreprises et la nécessité ou non d'un traitement correcteur,
- Si le traitement de l'essai a été interrompu,
- Son évolution. En cas d'évènement non fatal, l'évolution devra être suivie jusqu'à la guérison ou le retour à l'état antérieur ou à la stabilisation d'éventuelles séquelles,
- La relation de causalité entre cet évènement et le traitement à l'essai ou une contrainte liée à la recherche (période sans traitement, examens complémentaires demandés dans le cadre de la recherche etc. ...),
- La relation de causalité avec la biopsie, la pathologie traitée, une autre pathologie ou un autre traitement. L'investigateur doit également joindre au rapport d'évènement indésirable grave, à chaque fois que possible :
 - Une copie du compte-rendu d'hospitalisation ou de prolongation d'hospitalisation,
 - Une copie du rapport d'autopsie,
 - Une copie de tous les résultats d'examens complémentaires réalisés, y compris les résultats négatifs pertinents en y joignant les valeurs normales du laboratoire,
 - Tout autre document qu'il juge utile et pertinent.

Tous ces documents doivent être anonymisés.

Des compléments d'informations pourront être demandés (par fax, par téléphone ou lors d'une visite) par le moniteur.

Néanmoins, tout évènement attendu mais différent par son intensité, son évolution ou sa fréquence sera considéré comme inattendu par la pharmacovigilance.

6. Suivi des EIG

L'investigateur est responsable du suivi médical approprié des patients jusqu'à la résolution ou la stabilisation de l'effet ou jusqu'au décès du patient. **Cela peut impliquer parfois que ce suivi se prolonge après la sortie du patient de l'essai.**

Il transmet les informations complémentaires à la cellule de promotion de l'ICL à l'aide d'un formulaire de déclaration des EIG (en cochant la case Suivi n° X pour préciser qu'il s'agit d'un follow-up et non d'un rapport initial) dans les 48 heures suivant leur obtention. Il transmet également le dernier suivi à la résolution ou à la stabilisation de l'EIG.

Il conserve les documents concernant l'effet indésirable présumé afin de permettre, en cas de nécessité de compléter les informations précédemment transmises.

Il répond aux demandes d'informations complémentaires de la CRPV de Lorraine afin de documenter l'observation initiale.

7. Rapport annuel de sécurité (RAS)

A la date anniversaire de l'autorisation d'essai délivré par les Autorités de Santé, le promoteur rédige en collaboration avec la CRPV un rapport de sécurité comprenant :

- La liste des effets indésirables graves susceptibles d'être liés à la biopsie incluant les EIG inattendus et attendus.
- une analyse concise et critique de la sécurité des patients se prêtant à la recherche.

Ce rapport peut être soumis à l'investigateur coordonnateur pour approbation.

Ce rapport est envoyé à l'ANSM et au CPP dans les 60 jours suivant la date anniversaire de l'autorisation d'essai.

b) Conduite à tenir en cas d'événement non graves

Tous les événements indésirables non graves (Hémorragie sur le site de biopsie sans préjudice sur l'hémogramme, infection cutanée ou/et sous cutanée bénigne, cicatrisation inesthétique, malaise vagal consécutif au geste ou à la douleur imputée), définis dans le protocole comme déterminants pour l'évaluation de la sécurité des personnes qui se prêtent à l'essai clinique seront reportés dans le cahier d'observation, ils feront l'objet d'un suivi jusqu'à résolution. L'investigateur jugera de la causalité à l'examen de l'essai et à la pathologie.

c) Conduite à tenir en cas d'événement indésirable : faits nouveaux

En cas de survenue d'un fait nouveau inhérent à la recherche et susceptible de porter atteinte à la sécurité des personnes qui s'y prêtent, le promoteur et l'investigateur prendront les mesures de sécurité urgentes appropriées.

Le promoteur informera sans délai l'ANSM et le CPP concerné de ces faits nouveaux et, le cas échéant, des mesures prises.

9) Conception de la recherche

a) Définition et durée de l'étude

Il s'agit d'une étude ouverte prospective non randomisée multicentrique.

Actuellement, et du fait de l'absence de test prédictif fiable de la toxicité radique, il n'existe pas, en pratique courante, d'adaptation personnalisée de la dose délivrée et/ou de son étalement/fractionnement.

Notre démarche s'inscrit dans la dynamique de création d'une véritable base de données nationale permettant un suivi sur le long terme des patients traités par RT dans l'enfance.(43)

Durée de l'étude :

- Durée des inclusions : 24 mois
- Durée de suivi des patients : (mettre ici le délai total de suivi puis (pour l'objectif principal: 3 mois ; 15 ans pour les objectifs secondaires)
- Durée globale de l'étude : 17 ans

Des analyses intermédiaires seront réalisées à 5 ans et 10 ans pour les objectifs secondaires.

b) Inclusion des patients

Après l'annonce à un enfant/adolescent et à ses parents du diagnostic de cancer dont le traitement local comportera une radiothérapie, la participation à l'étude sera systématiquement proposée par le médecin prenant en charge le patient et au cours d'une consultation prévue.

1. Bilan d'inclusion

Il comprendra :

- Le recueil du consentement éclairé signé après information du patient et des deux parents ou du représentant légal le cas échéant
- Le recueil, la vérification et la validation des critères d'inclusion/exclusion à partir de la visite initiale
- L'anamnèse médicale et le recueil des traitements concomitants
- L'examen clinique initial

2. Réalisation de la biopsie

La biopsie sera effectuée après l'obtention du consentement éclairé et lors d'une consultation habituelle ou d'une anesthésie générale programmée dans le cadre de la prise en charge du patient. Elle devra être réalisée avant le début de la chimiothérapie ou de la radiothérapie selon les cas.

3. Bilans de suivi

Il ne sera réalisé aucun bilan clinique ou paraclinique additionnel non prévu dans la prise en charge conventionnelle des patients. Un recueil de données sera effectué 3 mois après le

début de la radiothérapie puis de façon annuelle pendant les 3 premières années puis tous les 5 ans pour une durée totale minimale de 15 ans.

4. Surveillance

Selon les recommandations professionnelles

5. Tableau récapitulatif du déroulement de l'essai

VISITES	Bilan d'inclusion V0	Biopsie	Visites hebdomadaires en cours de radiothérapie (classique)							Bilan à 3 mois	Bilan annuel (conventionnel)	Fin d'étude
			V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7			
BILAN INITIAL												
Information + Consentement éclairé signé de l'enfant et des 2 parents	X											
Critères d'inclusion/exclusion	X											
Anamnèse médicale	X											
Traitements concomitants	X											
BILAN CLINIQUE												
Examen clinique initial	X											
BIOPSIE		X										
SUIVI												
Evaluation des toxicités aiguës liées à la RT			X	X	X				X		X	Jusqu'à leur disparition
Evaluation des toxicités tardives liées à la RT											X	X

c) Déroulement de l'étude

1. Prélèvements chez l'enfant

Ils seront réalisés après avoir obtenu la signature du consentement éclairé de la part des deux parents et de l'enfant en fonction de son âge.

La biopsie de peau (2 mm² prélevés au niveau de la fesse) sera réalisée par l'oncopédiatre ou le radiothérapeute référent du patient.

Les prélèvements doivent être adressés à l'état frais, anonymisés, et dans les 48 heures à l'Institut de Cancérologie de Lorraine,.

2. Culture cellulaire

La biopsie de peau sera mise en culture afin d'obtenir une lignée fibroblastique non-transformée propre au patient qui sera en outre conservée avec l'autorisation du patient et/ou de ses représentants légaux.

3. Irradiation des échantillons

Acheminés à température ambiante au CRCL de Lyon, les fibroblastes du patient sont ensemencés sur des lamelles stériles 2 jours avant l'irradiation. Une dose unique de 2 Gy est délivrée dans le département de RT du Centre Léon Bérard (Lyon).

4. Réalisation des tests

Les cellules irradiées et témoins sont fixées à des temps stratégiques (10 min, 1 heure, 4 heures et 24 heures). Les membranes cellulaires sont ensuite lysées avant que les noyaux soient hybridés par les anticorps primaires dirigés contre les protéines d'intérêt : H2AX, MRE11 et ATM. Un anticorps secondaire couplé au FITC est ensuite appliqué. Les lames sont finalement montées avec du Vectashield™ couplé avec le DAPI. Cette étape protège la fluorescence des protéines d'intérêt tout en révélant le noyau.

En fonction des résultats observés d'autres marqueurs de signalisation de la réparation seront testés par la même méthode.

Les lames sont finalement lues en aveugle au microscope à fluorescence (immersion dans l'huile, comptage de 50 noyaux/lamelle, Gx100, filtre pour FITC et DAPI). Les mesures sont répétées indépendamment à trois reprises. Le nombre moyen de spots (foci) par cellule pour chaque temps de réparation est alors obtenu, ce qui permet de tracer les cinétiques d'apparition/disparition propres à chaque protéine d'intérêt, chaque statut génétique, et chaque condition de culture (chimiothérapie le cas échéant). L'ensemble des résultats permettra de classer les patients en groupes de radiosensibilité individuelle.

Un test contrôle sera réalisé sur les mêmes échantillons. La contre coloration au DAPI rend possible la visualisation des micronoyaux sans surcoût. Le taux de micronoyaux radio-induits a été quantitativement corrélé à la radiosensibilité depuis les années 1960 et fut le premier test cytogénétique prédictif.(2) Enfin l'activité kinase nucléaire de la protéine pATM sera évaluée à 10 minutes et 1 heure après irradiation afin d'en rechercher la valeur maximale et le point de temps correspondant.

Les lames seront analysées au laboratoire de radiobiologie de l'unité Inserm CRU1052 au CRCL de Lyon (Nicolas Foray)

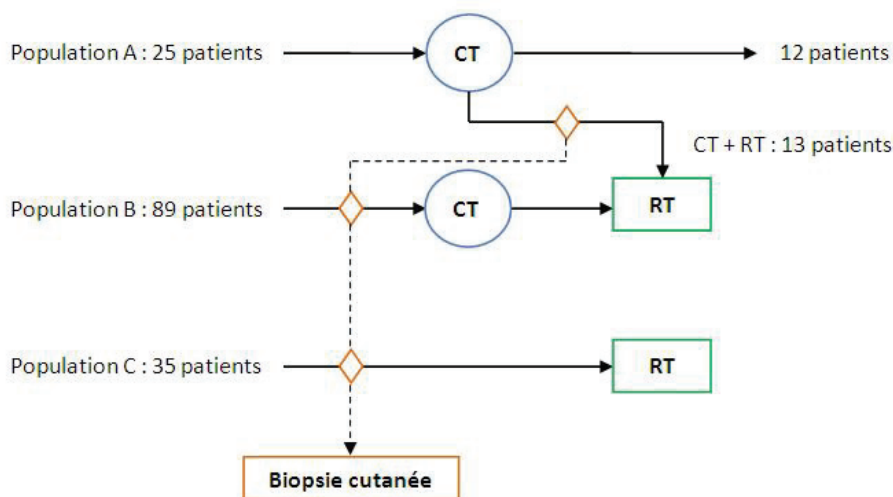
5. Recueil des données cliniques

Les patients seront suivis de manière hebdomadaire durant toute la durée de la RT, puis selon les recommandations de suivi propre à leur pathologie. Les toxicités aiguës seront rapportées une fois par semaine pendant la RT jusqu'à leur disparition et cotées selon l'échelle NCI-CTACE v4.0. (http://www.cepd.fr/CUSTOM/CEPD_toxicite.pdf)
L'étude se termine à 3 mois de la fin de la RT (pour l'objectif principal)

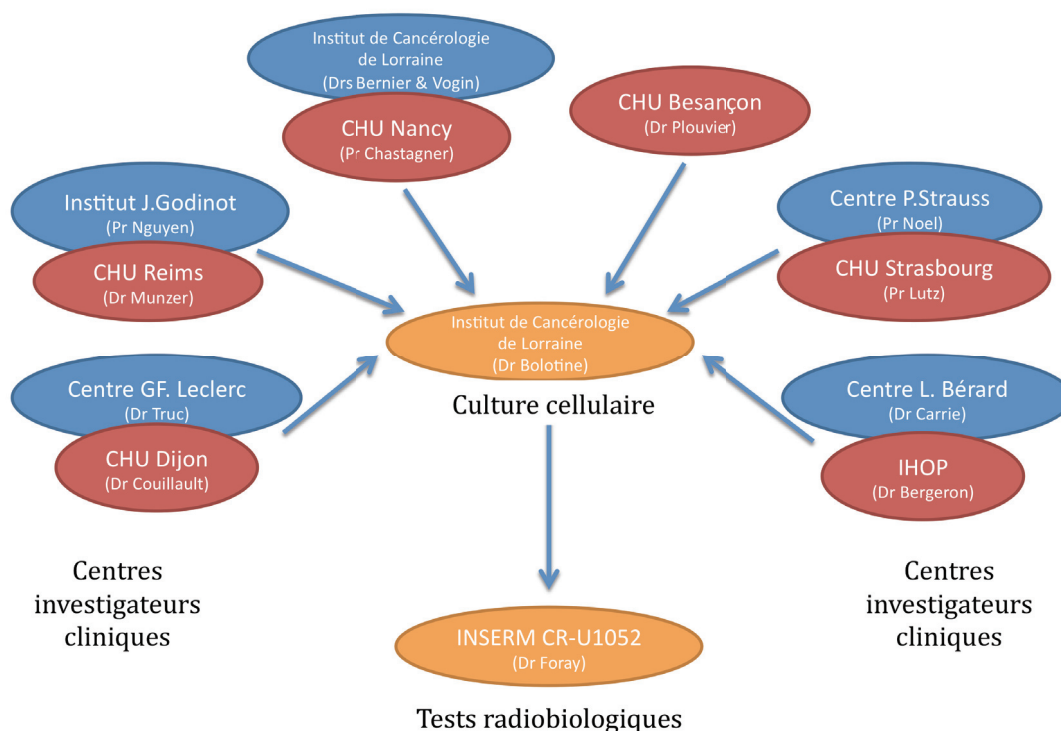
Les effets tardifs, y compris les seconds cancers, seront recherchés et reportés au cours de consultations annuelles systématiques auprès de l'oncopédiatre ou du radiothérapeute et selon la même échelle NCI-CTACE v4.0.

En parallèle, la dose délivrée aux organes à risque sera systématiquement recueillie sur la dosimétrie prévisionnelle ainsi que les données cliniques (éventuelles toxicités tardives) dans le cadre de la mise en place d'une base de données nationale (HOPE-pediaRT).

Aucun examen spécifique ne sera demandé au cours du suivi dans le cadre de cette étude.



d) Logistique générale de la recherche



10) Sortie d'étude

Toute demande d'arrêt d'un patient à l'essai pour quelque raison que ce soit.

Arrêt prématuré de l'étude : L'étude pourra être interrompue pour des raisons administratives, et/ou sur décision du promoteur. Si l'étude est arrêtée prématurément ou suspendue, le promoteur informera immédiatement les investigateurs et le Comité de Protection des Personnes (CPP) de la raison de l'arrêt ou de la suspension ainsi que l'ANSM.

11) Description des données collectées

a) Description des données recueillies

Un cahier d'observation sera mis en place par le Dr Véronique GILLON, pharmacien, responsable du Centre de Recherche Clinique de l'Institut de Cancérologie de Lorraine. La saisie des données et le contrôle qualité seront réalisés par les AECs (Assistants d'Etudes Cliniques de l'unité de Recherche Clinique de l'Institut de Cancérologie de Lorraine). L'ensemble des données cliniques sera validé par Julia SALLERON, membre de l'Unité Activité et Statistiques Médicales qui assurera également l'analyse statistique.

Le cahier d'observation individuel du patient comportera notamment :

- Les données démographiques
- Les habits (notamment tabagisme)
- La description de la maladie (données histologiques et stade)
- Les antécédents médicaux (diabète, maladie inflammatoire chronique, maladie génétique, immunodéficience, ...)
- Les données médicales initiales dont IMC
- Les heures des bilans sanguins usuels péri opératoires
- Les traitements administrés (chirurgie, radiothérapie)
- Les données médicales du patient pendant le suivi notamment concernant la toxicité aigue à la RT (annexe V)
- La traçabilité des lignées cellulaires établies à partir des divers prélèvements
- Les paramètres radiobiologiques mesurés sur ces lignées
- L'enregistrement des évènements indésirables et des évènements indésirables graves pendant la période de la recherche

Les données individuelles du patient seront anonymisées

a) Collection d'échantillon d'origine biologique

1. Nature des échantillons

L'étude ARPEGE impose uniquement le recueil de fibroblaste par biopsie cutanée

2. Conditions de prélèvement

La biopsie cutanée sera réalisée après avoir obtenu la signature du consentement éclairé de la part des deux parents et de l'enfant en fonction de son âge. La biopsie de peau (2 mm² prélevée au niveau de la fesse) sera réalisée par l'oncopédiatre ou le radiothérapeute référent du patient.

Selon le scénario (A,B ou C), la biopsie sera réalisée initialement ou après la chimiothérapie néo adjuvante et avant toute radiothérapie(par exemple durant la chirurgie).

Dans la mesure du possible, on profitera d'une anesthésie générale ; à défaut, la biopsie pourra être réalisée sous anesthésie locale transcutanée type EMLA, associée éventuellement à l'inhalation d'un mélange oxygène - protoxyde d'azote (MEOPA) selon les pratiques locales.

3. Modalités de codage et d'étiquetage

4. Modalités de traitement des échantillons

5. Conditions de transport

6. Modalités de stockage

7. Modalités de gestion des échantillons

8. Gestion informatique des données relatives aux échantillons

9. Conditions de traçabilité

12) Analyse statistique

a) Nombre de sujet nécessaire

1. Justification

L'objectif principal étant d'évaluer la valeur du test IFI pour prédire le risque de toxicité aigue, le calcul du nombre de sujets nécessaires est basé sur l'estimation de l'aire sur la courbe ROC (AUC ;[24])

Nous souhaitons démontrer que l'AUC est supérieure à 0.7 (=AUC₀). Le calcul est basé sur le test unilatéral : H₀: AUC₁ <= AUC₀ vs H_a: AUC₁ > AUC₀. Nous estimons l'AUC observée sera de 0,85 (AUC₁=0,85). En se basant sur 15% de toxicité aigue [4] et un risque de première espèce à 5%, il faut recruter 157 sujets pour obtenir une puissance supérieure à 0.8 (précisément 0.813).

Notons qu'avec 157 patients, un nombre de 24 toxicités aigues et de 8 toxicités tardives est attendu.

2. Faisabilité

L'ensemble des enfants et adolescents traités à visée curative pour les tumeurs éligibles dans les départements d'oncologie pédiatrique et de RT de l'axe Rhin-Rhône (Nancy, Strasbourg, Dijon, Besançon, Reims et Lyon) pourront être inclus, ce qui représente environ 150 patients sur une année selon les données de 2011-2012 répartis ainsi : tumeurs cérébrales : 90 pts/an, tumeurs d'Ewing: 9 pts/an, tumeurs mésoenchymateuses malignes: 12 pts/an, neuroblastomes: 10 pts/an, néphroblastomes: 7 pts/an, lymphomes de Hodgkin: 9 pts/an

- 25 patients pourraient bénéficier de RT uniquement en cas de réponse insuffisante à la CT néoadjuvante. Cette donnée est connue tardivement.. Seulement la moitié de la population initiale serait irradiée. La biopsie sera donc réalisée juste avant la RT. (population A)
- 89 patients pourraient bénéficier de CT néoadjuvante avant la RT (population B)
- 35 patients pourraient bénéficier de RT non précédée de CT (population C)

Pour les populations B et C, la biopsie sera réalisée au début de la prise en charge.

Au final, environ xxx patients/an sont incluables à Nancy,, zzz patients/an sont incluables à Lyon

b) Analyse statistique

1. Responsable de l'analyse statistique

J. SALLERON – Unité d'activité et de statistiques médicales
Institut de Cancérologie de Lorraine

2. Calcul d'effectif

Le protocole prévoit l'inclusion de 157 patients

3. Description du plan d'analyse statistique

Analyse de l'objectif principal :

La courbe ROC du test IFI sera décrite. Le test de l'hypothèse H_0 : $AUC \leq 0,7$ contre H_a : $AUC > 0,7$ sera effectué. L'aire sous la courbe ROC ainsi que son intervalle de confiance à 95% seront calculés.

Analyse des objectifs secondaires :

Les paramètres numériques seront décrits par la moyenne et leur intervalle de confiance à 95% ou par la médiane et l'intervalle interquartile en fonction de la normalité de la distribution. Les paramètres qualitatifs seront décrits par leur fréquence et leur pourcentage.

A court terme :

Nous déterminerons le seuil sur le test IFI qui maximise la sensibilité et la spécificité selon l'indice de Youden. Les intervalles de confiance à 95% de la sensibilité et de la spécificité seront déterminés.

L'AUC du test IFI sera comparée à celle du test des micronoyaux par l'approche non-paramétrique proposée DeLong, DeLong, and Clarke-Pearson.[26] La sensibilité et la spécificité de chacun des tests seront comparées par un test de Mac Nemar.

A long terme :

Les résultats du test IFI seront décrits et comparés en fonction de différents critères (survenue de tumeurs secondaires, de toxicités tardives de grade 3-4 ou de séquelles graves) par un test non paramétrique de Mann-Whitney. Si une différence est constatée alors le seuil sur le test IFI maximisant la sensibilité et la spécificité sera recherché. Le test de Mann-Whitney sera également utilisé pour analyser le lien entre le degré de sévérité d'une toxicité aiguë et l'apparition d'une toxicité tardive ou d'une séquelle grave.

Le lien entre la survenue de toxicités aiguës et de toxicités tardives sera étudié par un test du Chi-deux ou du Fisher Exact.

c) Contrôle et assurance qualité des données

Afin de garantir l'authenticité et la crédibilité des données conformément aux BPC, le promoteur met en place un système d'assurance qualité qui comprend :

- La gestion de l'essai selon les procédures de l'ICL,
- Le contrôle qualité des données du site investigateur par le moniteur dont le rôle est de vérifier la concordance et la cohérence des données du cahier d'observation par rapport aux documents-sources,
- L'audit éventuel de centres investigateurs,
- La revue centralisée de certains critères du protocole (à préciser).

1. Centralisation des données

L'ensemble des données cliniques et biologiques seront centralisées à l'ICL

2. Recueil, suivi, traitement et conservation des données

i. Définition des données sources

Afin de garantir l'authenticité et la crédibilité des données, conformément aux Bonnes Pratiques Cliniques, le Promoteur met en place un système d'assurance qualité qui comprend recueil, suivi, traitement et conservation des données
Tous les documents de l'étude sont considérés comme confidentiels.

Toutes les données requises par cette recherche doivent être consignées, dans les meilleurs délais dans les cahiers d'observation de l'essai. L'entrée des données dans le cahier d'observation doit être faite à l'aide d'un stylo à bille et doit être lisible. Les crayons et fluides ne doivent pas être utilisés.

Si des corrections s'avèrent nécessaires, elles sont faites par l'investigateur ou un membre autorisé de son équipe.
Les données seront ensuite saisies dans la base de données créée à cet effet.

ii. Saisie informatique des données

La collecte des données cliniques reposera sur la mise en place d'une base de données clinique et la création de masques de saisie à l'image du cahier d'observation en conformité avec le protocole et les réglementations actuellement en vigueur.

La structure de la base de données et des écrans de saisie sera approuvée par l'investigateur coordinateur de l'essai.

iii. Description des modalités de traitement, de vérification, de validation des données (data – management)

Les données de cette étude feront l'objet d'une étape de validation afin de vérifier l'exhaustivité, l'authenticité, la précision et la cohérence des données. Des demandes de clarifications seront émises pour résoudre les inexactitudes rencontrées.

Les données seront stockées et sauvegardées sur un serveur dédié.

Les tables de la base de données de correction pourront être émises par le centre de data-management. Celles-ci devront être complétées de la même façon par les personnes autorisées à compléter le CRF.

iv. Gestion et conditions d'archivage des documents de l'essai

Tous les documents sont considérés comme confidentiels.

A la fin de l'étude, les médecins investigateurs principaux conserveront sous leur responsabilité, dans leurs centres respectifs, l'ensemble des documents relatifs à l'étude (copie de protocole, copies de cahiers d'observation, dossier investigateur, liste d'identification des patients, apports d'examen cliniques, ...), pour un archivage pendant minimum 15 années sous tous les documents relatifs à l'étude, toutes les données recueillies et leurs analyses sont la propriété de l'Institut de Cancérologie de Lorraine. Ils devront obligatoirement être archivés par l'investigateur coordinateur pour une durée de 15 ans à l'Institut de Cancérologie de Lorraine (arrêté du 08 Novembre 2006).

d) Aspects réglementaires

1. Responsabilités du promoteur

Le promoteur de l'étude clinique (Institut de Cancérologie de Lorraine), prend l'initiative de cette recherche ; il assure la gestion et vérifie que son financement est prévu.

Les principales responsabilités du promoteur sont :

- L'obligation de souscription d'une assurance de responsabilité civile,
- La demande d'avis du projet initial et des amendements substantiels auprès du CPP,
- La demande d'un numéro d'enregistrement du projet initial et des amendements substantiels auprès de l'autorité compétente,
- La déclaration à l'autorité compétente du début et de la fin de l'étude,
- La rédaction du rapport final de l'étude,
- L'information des résultats de l'étude à l'autorité compétente, au CPP et aux participants à la recherche,
- L'archivage des documents essentiels de l'étude dans le classeur promoteur pour une durée minimale de 15 ans après la fin de la recherche.

2. Responsabilités des investigateurs

Les investigateurs s'engagent à ce que cette étude soit réalisée en conformité avec la loi Huriet (N° 88-1138) du 20 Décembre 1988 relative à la protection des personnes modifiée par la loi de santé publique (N° 2004-806) du 9 Août 2004, les lois bioéthiques (N° 2004-800) du 6 Août 2004, la loi informatique et liberté (N° 78-17) du 6 Janvier 1978 modifiée par la loi relative à la protection des personnes physiques à l'égard des traitements à caractère personnel (N° 2004-801) du 6 Août 2004, ainsi qu'en accord avec les bonnes pratiques cliniques de la Conférence Internationale d'Harmonisation (ICH-E6 17/07/96) et aux principes éthiques de la dernière version en vigueur de la déclaration d'Helsinki. Toutes les données, tous les documents et rapports pourront faire l'objet d'audits de l'inspection réglementaire.

L'investigateur principal s'engage à conduire l'étude clinique conformément au protocole qui a été autorisé par le CPP et l'ANSM.

L'investigateur ne doit apporter aucune modification au protocole sans l'autorisation écrite du promoteur et sans que le CPP et l'autorité compétente ait donné leur autorisation sur les modifications proposées.

Il est de la responsabilité de l'investigateur principal :

- De fournir au promoteur son curriculum vitae,

- D'identifier les membres de son équipe qui participent à l'étude et de définir leurs responsabilités,
- De démarrer le recrutement des patients après autorisation du promoteur,
- D'obtenir l'accord de participation du patient avant de l'inclure dans l'étude,
- De reporter les informations médicales dans le cahier d'observation conformément au protocole

3. Information et consentement des participants

Préalablement à la réalisation d'une recherche biomédicale visant à l'évaluation des soins courants sur des personnes, l'investigateur informe de façon exhaustive les deux parents ou le détenteur de l'autorité parentale. L'assentiment du patient sera systématiquement recherché. Le consentement libre, éclairé et écrit est remis aux différentes parties énoncées ci-dessus pour signature, il est ensuite recueilli et signé par l'investigateur. Cette étude rentre dans la catégorie de soins courants, il n'y a pas d'obligation de recueil de consentement éclairé et signé dans cette catégorie d'étude, mais juste l'obligation d'informer de façon complète et loyale en termes compréhensibles, le patients des objectifs de l'étude, de ses droits de refuser de participer à l'étude ou de la possibilité de se rétracter à tout moment. Toutes ces informations figurant sur une note d'information et de non opposition remis au patient.

4. Comité de protection des personnes - Autorité compétente - CNIL

L'étude sera menée en conformité avec la réglementation en vigueur et sera soumise au Comité de Protection des Personnes CPP III-Est par le promoteur.

Avant de réaliser une recherche sur l'être humain, le promoteur est tenu d'en soumettre le projet à l'avis de l'un des comités de protection des personnes compétents pour le lieu où l'investigateur coordonnateur exerce son activité et à l'autorisation de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé.

La demande d'avis du projet de recherche biomédicale est adressée au comité et à l'autorité compétente par le promoteur.

Les demandes de modifications substantielles des projets initiaux sont également adressées par le promoteur au comité pour avis et à l'autorité compétente pour autorisation.

L'étude fera l'objet d'une déclaration à la CNIL, les données individuelles communiquées au promoteur seront anonymisées. La transmission des consentements éclairés au promoteur se fera sous enveloppe scellée.

5. Assurance

Dans la mesure où la recherche est bien qualifiée de Recherche en soins courants par le CPP sollicité (dans notre cas CPP III-Est), ce qui signifie l'absence de risque supplémentaire liée à l'étude, l'assurance sera celle de l'établissement responsable des soins (article L.1142-2)

e) Amendements au protocole

Dans le cas où des modifications au protocole s'avèreraient nécessaires, elles seront d'abord soumises à l'avis du promoteur de l'étude. Après réception de l'accord du, ces amendements seront ensuite soumis à l'avis du CPP III-Est.

De même, si des modifications ont été effectuées dans le protocole concernant les données recueillies (nouvelles données, augmentation de la durée du suivi.....), le protocole doit être soumis à nouveau au Comité consultatif sur le traitement de l'information en matière de recherche dans le domaine de la santé puis à la CNIL.

f) Confidentialité des sujets

L'investigateur s'assurera que l'anonymat de chaque patient participant à l'étude est garanti en attribuant lors de l'inclusion des patients un numéro d'ordre et en n'utilisant que les initiales comme mode d'identification.

g) Propriétés des données

L'investigateur s'engage, pour lui-même et pour toutes les personnes amenées à suivre le déroulement de l'étude, à garantir la confidentialité de toutes les informations fournies du début de l'étude jusqu'à la publication des résultats. Cette obligation de confidentialité ne s'appliquera pas aux renseignements que l'investigateur sera amené à communiquer aux patients dans le cadre de leur participation à l'étude ni aux informations déjà publiées.

Les investigateurs s'engagent à ne pas publier, divulguer ou utiliser, de quelque façon que ce soit, directement ou indirectement, les informations scientifiques ou techniques en relation avec l'étude.

Néanmoins, conformément à l'article R 5121-13 du Code de la Santé Publique, le centre et l'investigateur coordonnateur pourront donner des informations relatives à l'étude au (x) :

- Ministre chargé de la santé,
- Médecins inspecteurs de santé publique,
- Pharmaciens inspecteurs de santé publique,
- Directeur Général et inspecteurs de l'ANSM.

Toutes les données de l'étude sont la propriété de l'Institut de Cancérologie de Lorraine.

13) Règles de publication

Toutes les informations résultant de cet essai sont considérées comme confidentielles jusqu'à la publication des résultats. Toutes les données étant confidentielles, ce qui est confié à Lyon pour l'exploitation est donc confidentiel.

Le Co-coordonnateur sera cité en premier auteur lors de toute publication qui résultera de cette étude et le directeur de thèse à Lyon en dernier auteur.

Toutes les publications, abstracts ou présentations comprenant les résultats de l'essai doivent être soumis au préalable pour approbation au promoteur (ICL) et le promoteur sera cité avec au moins un auteur dans les 3 premières places.

Les données générées par le centre de radiobiologie de Lyon font partie de l'étude mais leur moyen d'obtention grâce à un algorithme spécifique est secret et reste propriétaire du centre de radiobiologie de Lyon.

Par ailleurs, toutes les communications orales ou écrites, manuscrits ou présentations doivent comporter une rubrique qui mentionne impérativement l'ICL comme promoteur de l'essai.

14) Références bibliographiques

- [1] Lacour B, Guyot-Goubin A, Guissou S, Bellec S, Desandes E, Clavel J. Incidence of childhood cancer in France: National Children Cancer Registries, 2000-2004. *Eur J Cancer Prev.* May;19(3):173-81.
- [2] Desandes E, Lacour B, Belot A, White-Koning M, Velten M, Tretarre B, et al. [Cancer incidence and survival among adolescents and young adults in France (1978-1997)]. *Bulletin du cancer.* 2007 Apr;94(4):331-7.
- [3] Desandes E, Bonnay S, Berger C, Brugieres L, Demeocq F, Laurence V, et al. Pathways of care for adolescent patients with cancer in France from 2006 to 2007. *Pediatric blood & cancer.* Jun;58(6):924-9.
- [4] Krasin MJ, Hoth KA, Hua C, Gray JM, Wu S, Xiong X. Incidence and correlates of radiation dermatitis in children and adolescents receiving radiation therapy for the treatment of paediatric sarcomas. *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain)).* 2009 Dec;21(10):781-5.
- [5] Baumann M, Holscher T, Begg AC. Towards genetic prediction of radiation responses: ESTRO's GENEPI project. *Radiother Oncol.* 2003 Nov;69(2):121-5.
- [6] Jereczek-Fossa BA, Zerini D, Fodor C, Santoro L, Serafini F, Cambria R, et al. Correlation between acute and late toxicity in 973 prostate cancer patients treated with three-dimensional conformal external beam radiotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* Sep 1;78(1):26-34.
- [7] Dorr W, Hendry JH. Consequential late effects in normal tissues. *Radiother Oncol.* 2001 Dec;61(3):223-31.
- [8] de Vathaire F, Hawkins M, Campbell S, Oberlin O, Raquin MA, Schlienger JY, et al. Second malignant neoplasms after a first cancer in childhood: temporal pattern of risk according to type of treatment. *Br J Cancer.* 1999 Apr;79(11-12):1884-93.
- [9] Guerin S, Guibout C, Shamsaldin A, Dondon MG, Diallo I, Hawkins M, et al. Concomitant chemo-radiotherapy and local dose of radiation as risk factors for second malignant neoplasms after solid cancer in childhood: a case-control study. *Int J Cancer.* 2007 Jan 1;120(1):96-102.
- [10] Rube CE, Fricke A, Schneider R, Simon K, Kuhne M, Fleckenstein J, et al. DNA repair alterations in children with pediatric malignancies: novel opportunities to identify

patients at risk for high-grade toxicities. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. Oct 1;78(2):359-69.

[11] Tucker SL, Turesson I, Thames HD. Evidence for individual differences in the radiosensitivity of human skin. *Eur J Cancer*. 1992;28A(11):1783-91.

[12] 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. *Int J Cancer*. 1998 Dec 18;79(6):606-13.

[13] Emami B, Lyman J, Brown A, Coia L, Goitein M, Munzenrider JE, et al. Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1991 May 15;21(1):109-22.

[14] Rogers PB, Plowman PN, Harris SJ, Arlett CF. Four radiation hypersensitivity cases and their implications for clinical radiotherapy. *Radiother Oncol*. 2000 Nov;57(2):143-54.

[15] Barnett GC, Coles CE, Elliott RM, Baynes C, Luccarini C, Conroy D, et al. Independent validation of genes and polymorphisms reported to be associated with radiation toxicity: a prospective analysis study. *The lancet oncology*. Jan;13(1):65-77.

[16] 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 Oct 15;11(20):7426-33.

[17] Dikomey E, Borgmann K, Hoeller U. Individual radiosensitivity measured with lymphocytes: late effects are the key point: in regard to borgmann et Al. (*Int j radiat oncol biol phys* 2008;71:256-264) and in reply to Dr. Azria. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2009 Jun 1;74(2):654; author reply -5.

[18] 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 Apr 29;100(9):5057-62.

[19] Iliakis G. The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. *Bioessays*. 1991 Dec;13(12):641-8.

[20] 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 Nov;74(5):551-60.

[21] Joubert A, Zimmerman KM, Bencokova Z, Gastaldo J, Chavaudra N, Favaudon V, et al. DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response: at least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity? *Int J Radiat Biol*. 2008 Feb;84(2):107-25.

[22] Carrie C, Mahe MA. [Organization of the pediatric radiation oncology in France]. *Cancer Radiother*. 2009 Oct;13(6-7):525-6.

[23] Singer AJ, Arora B, Dagum A, Valentine S, Hollander JE. Development and validation of a novel scar evaluation scale. *Plastic and reconstructive surgery*. 2007 Dec;120(7):1892-7.

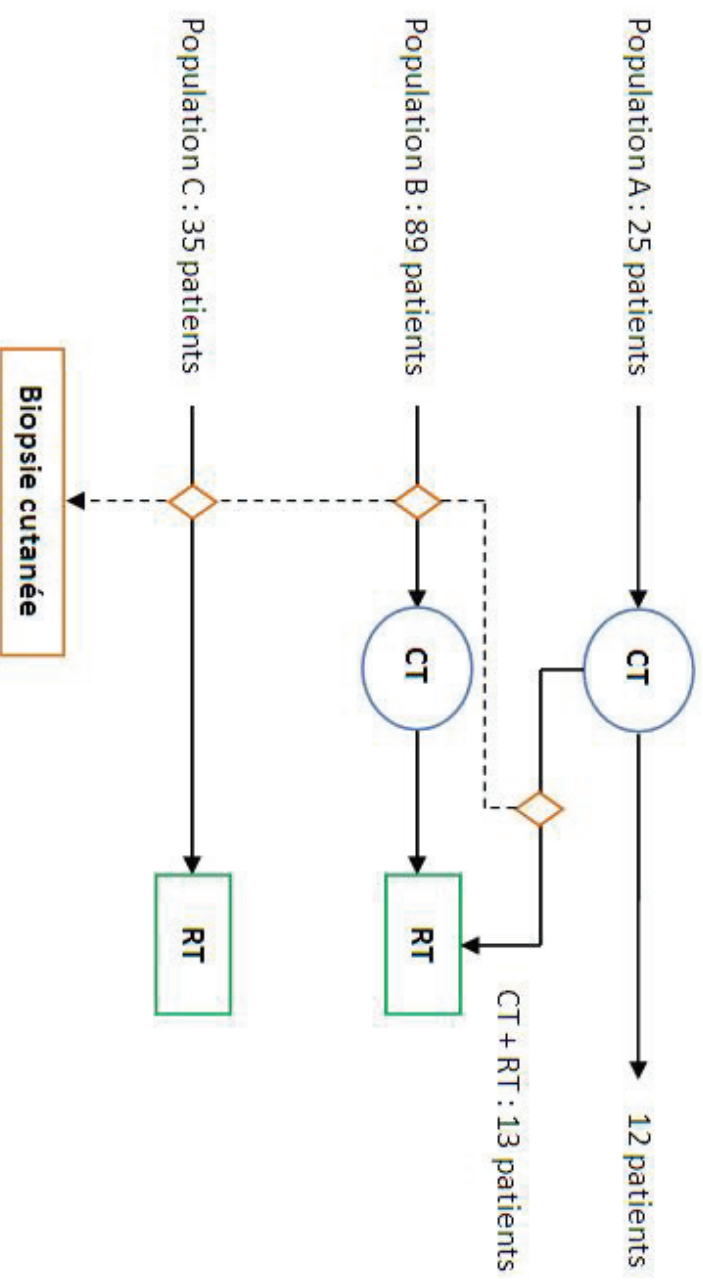
[24] Hanley JA, McNeil BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology*. 1982 Apr;143(1):29-36.

[25] Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation research*. 2000 Nov 20;455(1-2):81-95.

[26] DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics*. 1988 Sep;44(3):837-45.

[27] 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:in press.

Annexe 1 – Tableau récapitulatif des investigations



ANNEXE 2 : LISTE DES INVESTIGATEURS PARTICIPANTS

Nom	Prénom	Institution	Service	Qualification	Adresse 1	Adresse 2	Code Postal	Ville	Pays
NOEL	Georges	Centre Paul Strauss	Département de Radiothérapie	Radiothérapeute	3 Rue de la porte de l'hôpital	BP 42	67 065	STRASBOURG CEDEX	FRANCE
NGUYEN	Tan-Dat	Institut Jean-Godinot	Département de Radiothérapie	Radiothérapeute	1 Rue du général Koenig	BP 171	51 056	REIMS CEDEX	FRANCE
TRUC	Gilles	Georges-François-Leclerc	Département de Radiothérapie	Radiothérapeute	1 Rue du professeur Marion		21 034	DIJON CEDEX	FRANCE
CARRIE	Christian	Centre Léon Bérard	Département de Radiothérapie	Radiothérapeute	28 Promenade Léa et Napoléon Bullukian		69 008	LYON	FRANCE
CLAUDE	Line	Centre Léon Bérard	Département de Radiothérapie	Radiothérapeute	29 Promenade Léa et Napoléon Bullukian		69 008	LYON	FRANCE
CHASTAGNER	Pascal	Hôpital d'enfants, CHU	Service d'oncologie	Oncopédiatre	5 Rue du		54 500	VANDOEUVRE-	FRANCE

		Nancy	pédiatrique		Morvan			LES-NANCY	
ROHRLICH	Pierre-Simon	CHU de Besançon, Hôpital Saint-Jacques	Service d'oncologie pédiatrique	Oncopédiatre	2 Place St Jacques		25 030	BESANCON	FRANCE
PLOUVIER	Emmanuel	CHU de Besançon	Service d'oncologie pédiatrique	Oncopédiatre	3 Place St Jacques		25 000	BESANCON	FRANCE
COULLAULT	Gérard	CHU de Dijon	Service d'oncologie pédiatrique	Oncopédiatre	10, Avenue du Maréchal de Latre de Tassigny		21 034	DIJON CEDEX	FRANCE
MUNZER	Martine	CHU de Reims	Service d'oncologie pédiatrique	Oncopédiatre	47, Rue Cognacq Jay		51 092	REIMS CEDEX	FRANCE
LUTZ	Patrick	Hôpital du HAUTEPIERRE	Service d'oncologie pédiatrique	Oncopédiatre	Avenue Molière		67 098	STRASBOURG	FRANCE
BERGERON	Christophe	CHU de Lyon	IHOP	Oncopédiatre	5 Place d'Arsonval		69 003	LYON	FRANCE

ANNEXE 3: NOTICE D'INFORMATION AUX PARENTS DE PATIENTS PARTICIPANT A LA RECHERCHE BIOMEDICALE OU AUX PATIENTS EN AGE DE COMPRENDRE

ARPEGE : Analyse de la Radiosensibilité individuelle en oncologie PÉdiatrique dans l'interrégion Grand-Est

Promoteur : Institut de Cancérologie de Lorraine

6 Avenue de Bourgogne CS 30519 – 54519 Vandoeuvre-lès-Nancy

Investigateurs-Coordonnateurs :

Drs Valérie BERNIER & Guillaume VOGIN

Institut de Cancérologie de Lorraine

Département de radiothérapie

6 Avenue de Bourgogne CS 30519 – 54519 Vandoeuvre-lès-Nancy

Madame, Mademoiselle, Monsieur

Le médecin qui prend en charge votre enfant, vous propose de participer à cette évaluation dans le cadre d'une étude clinico-biologique menée à l'Institut de Cancérologie de Lorraine.

Avant de vous décider à participer à cette étude, il est important que vous en compreniez les objectifs. Ce document a été conçu afin de vous donner des informations détaillées sur cette étude. Vous êtes libre de discuter votre participation avec les membres de votre famille, vos amis ou votre médecin traitant. Vous pouvez poser toutes les questions qui pourraient vous venir à l'esprit au médecin qui vous a proposé de participer à l'étude.

➤ **Quel est l'objectif de l'étude ?**

L'équipe médicale en charge de la santé de votre enfant a estimé qu'un traitement par radiothérapie (RT) s'avère nécessaire. Ce traitement exploite la propriété des radiations ionisantes à détruire les cellules cancéreuses. Environ 200 000 patients dont 900 enfants sont traités par RT chaque année en France.

Tout être vivant possède une certaine capacité à réparer plus ou moins bien les dommages causés par les radiations ionisantes au niveau de ses cellules. Ces radiations, avant d'interagir avec la tumeur, traversent une certaine épaisseur d'organes en bonne santé appelés "organes à risque". Ces organes peuvent réagir durant ou peu après l'irradiation thérapeutique ce qui peut être à l'origine d'effets secondaires attendus et temporaires qui vous seront explicités par le radiothérapeute de votre enfant. Toutefois, comme avec tout traitement, des séquelles à plus ou moins long terme peuvent être observées chez moins de 10% des patients sans possibilité de les prévenir pour le moment.

Notre équipe cherche à valider chez l'enfant un test permettant d'expliquer pourquoi certains individus présentent des réactions inhabituelles aux rayons et de prévenir ces réactions. Ce dernier est réalisé à partir d'un prélèvement de peau de petite taille. Il s'agit d'étudier la proportion d'enfants plus sensibles aux radiations au sein de l'ensemble des enfants pris en charge dans les services de radiothérapie du Grand Est de la France sur deux années. A

terme, il s'agirait de délivrer une dose de rayons adaptée à la sensibilité de chaque enfant, afin d'augmenter les chances de guérison et d'éviter les toxicités.

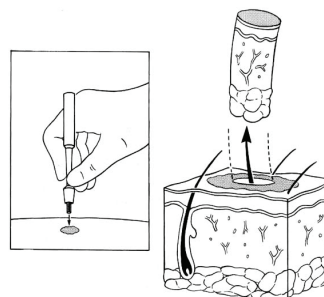
➤ **Qu'est-ce que votre participation à l'étude implique pour vous ?**

En participant à cette étude, vous acceptez que les données médicales concernant votre enfant soient recueillies et analysées. Le traitement de votre enfant ainsi que sa prise en charge globale sera classique pour ce type de pathologie que vous acceptiez ou non de participer à l'étude.

Afin de faire progresser la connaissance, les résultats de cette étude associés à ceux d'autres malades feront l'objet d'analyses comparatives et seront publiés dans des revues scientifiques spécialisées sous forme totalement anonyme concernant les personnes à l'origine des prélèvements.

➤ **Quel est le déroulement de l'étude ?**

Avant de commencer la RT, une très petite quantité de cellules sera prélevée au niveau de la peau de votre enfant (2 mm de diamètre et environ 2 mm de profondeur ; au niveau de la fesse). Ces prélèvements ne laisseront qu'une infime cicatrice de la taille du cylindre de biopsie (2 mm) sur le corps de votre enfant et seront réalisés dans des conditions d'asepsie classiques et dans la mesure du possible au cours d'une anesthésie générale programmée pour d'autres objectifs. Dans le cas contraire, ils seront réalisés sous anesthésie locale (MEOPA ; crème EMLA) associée éventuellement à d'autres mesures antalgiques selon les pratiques des centres.



Le prélèvement sera réalisé soit lors du bilan initial, soit avant de débiter la RT. Il sera envoyé à l'Institut de Cancérologie de Lorraine où il sera mis en culture. Les lignées seront ensuite expédiées au Groupe de Radiobiologie CRU 1052 de l'INSERM à Lyon pour réaliser le test mentionné précédemment à différents moments du processus de réparation cellulaire. Au préalable les échantillons cellulaires seront irradiés sur place au moyen d'un appareil de RT conventionnel avec lequel votre enfant sera traité. Cette délocalisation est liée au caractère hautement spécialisé de cette équipe et à son équipement d'un microscope à fluorescence dédié.

Les traitements par CT et RT se dérouleront selon les modalités habituelles définies par les protocoles de recherche (inter)nationaux dont dépend votre enfant. Ce traitement sera prolongé par une surveillance au long cours, classique, et ne comportant aucun examen supplémentaire découlant de cette étude.

➤ **Combien de personnes participeront à cette étude ?**

157 patients participeront à cette étude.

➤ **Quelle est la durée de votre (la) participation (de votre enfant) à cette étude ?**

Votre enfant est inclus au moment du diagnostic dès lors qu'une indication potentielle de RT pour traiter localement la tumeur est posée collégalement par l'équipe médicale. Le cas échéant, votre enfant débutera alors la chimiothérapie selon les recommandations en vigueur pour votre pathologie. La biopsie de peau sera réalisée au moment du diagnostic médical.

Dans le cas où le traitement de votre enfant ne requiert pas de chimiothérapie, la biopsie de peau sera réalisée avant de débuter la RT. Dans le cas où le traitement de votre enfant requiert de la CT, la biopsie sera effectuée :

- Avant cette dernière si l'indication de RT est déjà posée.
- A l'issue de la CT et avant de débuter la RT si l'indication de RT est incertaine au diagnostic,

Dans certains cas, l'indication de RT n'est posée que tardivement qu'en cas de réponse insuffisante de la tumeur à la chimiothérapie. Si votre enfant n'a pas besoin de RT, il sera sorti de cette étude puisque l'analyse de la sensibilité aux rayons n'a plus d'intérêt.

Pendant la RT, votre enfant sera reçu une fois par semaine par le radiothérapeute qui évaluera la façon dont l'organisme de votre enfant tolère le traitement. A trois mois, puis une fois/an votre enfant sera reconvoqué(e) par les médecins pour apprécier la toxicité retardée au traitement, tel que prévu par les recommandations professionnelles classiques s'appliquant à la tumeur dont votre enfant souffre.

➤ **Quels sont les risques possibles ?**

Il s'agit d'une étude sans bénéfice individuel direct

➤ **Quels sont les risques possibles ?**

Les biopsies de peau sont un acte sans danger, réalisé sous anesthésie et ne laissant qu'une minime cicatrice visible, de la taille du cylindre utilisé pour la biopsie (2mm). Le risque d'infection locale et de saignement est faible et facilement contrôlé par des mesures locales simples. Enfin, il est possible de constater une réaction allergique locale et banale au pansement adhésif. A plus long terme, certains individus peuvent développer indépendamment de leur cancer une cicatrice excessive appelée chéloïde. Cette cicatrice pouvant être disgracieuse, elle peut être corrigée par des mesures réparatrices généralement simples.

➤ **Vos droits**

Vous n'êtes en aucun cas obligé(e) de prendre part à l'étude. Un refus de participation ne modifiera en aucune façon vos rapports avec l'équipe médicale qui a pris en charge votre enfant, et la qualité des soins de votre enfant n'en sera nullement affectée. Aussi, nous vous demandons, si vous consentez à participer à l'étude, de signer le formulaire joint à ce document d'information. Vous pouvez refuser ou, en cas d'acceptation, retirer votre consentement à tout moment sans avoir à expliquer votre choix.

Les informations vous concernant sont strictement confidentielles et anonymisées. Le dossier médical de votre enfant restera confidentiel et ne pourra être consulté que sous la responsabilité du médecin s'occupant de son traitement. Peuvent aussi consulter le dossier de votre enfant les autorités de santé et les personnes dûment mandatées par l'organisateur de la recherche. Toutes sont soumises au secret professionnel.

Conformément aux dispositions de Loi relative à l'informatique et aux libertés (Loi n°78-17 du 6 janvier 1978 modifiée par la loi n°2004-801 du 6 août 2004), vous disposez d'un droit d'accès, de rectification des données vous concernant et d'opposition à la transmission de ces données. Ce droit s'exerce auprès de votre médecin qui seul connaît votre identité.

De plus selon les dispositions de la loi n° 2002-303 du 4 mars 2002 relative aux droits des malades, vous serez informé, à votre demande, des résultats globaux de l'étude par l'investigateur.

Cette étude est réalisée conformément aux dispositions du Code de la Santé Publique relatives aux recherches biomédicales. Dans ce cadre, elle a reçu :

- Un avis favorable du Comité de Protection des Personnes (CPP) Est III en date du
- Une autorisation auprès de l'ANSM en date du

Le promoteur a souscrit une assurance garantissant sa responsabilité civile pour couvrir les éventuelles conséquences préjudiciables de cette étude (NOM A PRECISER).

➤ **Des questions ?**

L'étude est menée dans votre établissement de soins sous la responsabilité du Dr Guillaume VOGIN. Celui-ci reste à votre disposition pour vous donner les renseignements et explications complémentaires que vous souhaitez à l'occasion des consultations prévues pendant et après la période de traitement. N'hésitez pas à reprendre rendez-vous si vous avez besoin d'autres informations.

Consentement parents

ARPEGE : Analyse de la Radiosensibilité individuelle en oncologie PÉdiatrique dans l'interrégion Grand-Est

Investigateurs coordonnateurs : Drs V.Bernier & G.Vogin

Promoteur : Institut de Cancérologie de Lorraine

Projet soutenu par la Société Française des Cancers de l'Enfant (SFCE)

Version n°1 du 11 Février 2014

Nous soussignés,

Madame.....(nom,
prénom) et

Monsieur.....(nom,
prénom), titulaire(s) de l'autorité parentale, certifions avoir lu et compris le document

d'information qui nous a été remis, et nous acceptons que notre

enfant.....(nom, prénom), né

le.....,

adresse.....

.....
...participe à l'étude **ARPEGE : Analyse de la Radiosensibilité individuelle en oncologie PÉdiatrique dans l'interrégion Grand-Est.**

ARPEGE a reçu en ce sens un avis favorable du Comité (nom exact du Comité et date) et de l'autorisation de l'autorité compétente (nom et date). **nom et coordonnées de l'assureur et numéro du contrat.**

Nous avons connaissance :

- Des objectifs et des désagréments pouvant résulter du prélèvement d'une biopsie de peau et d'échantillon(s) sanguin(s) afin d'étudier les capacités de réparation des cellules de notre enfant.
- Que notre enfant recevra un traitement par radiothérapie et chimiothérapie selon les recommandations de bonnes pratiques en vigueur.

Des informations orales et écrites (lettre d'information) nous ont été données. Nous avons eu la possibilité de poser toutes les questions que nous souhaitions au

Dr.....

Nous avons bénéficié d'un temps de réflexion suffisant entre ces informations et le présent consentement.

Nous connaissons la possibilité qui nous est réservée d'interrompre la participation de notre enfant à cette étude à tout moment sans avoir à justifier notre décision et nous ferons notre possible pour en informer le médecin qui suit notre enfant dans le cadre de cette recherche le Dr

Cela ne remettra pas en cause la qualité des soins ultérieurs de notre enfant.

Notre enfant est affilié ou bénéficie du régime de sécurité sociale comme l'exige la loi.

Nous acceptons que les données enregistrées à l'occasion de cette recherche comportant des données génétiques éventuelles, la date de naissance complète, commune de naissance, commune de résidence, sexe, origine ethnique, données cliniques dont éventuellement des données anciennes sur la maladie de notre enfant, données de traitements, résultats d'analyses biologiques et génétiques puissent faire l'objet d'un traitement informatisé par le promoteur ou pour son compte.

Si le diagnostic de notre enfant a été porté avant le début de l'étude nous acceptons que les données anciennes concernant l'histoire de sa maladie soient également recueillies.

Nous avons noté que le droit d'accès prévu par la loi du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés (article 39) s'exerce à tout moment auprès du médecin qui me suit dans le cadre de la recherche et qui connaît mon identité.

Nous pourrions exercer notre droit de rectification et d'opposition auprès de ce même médecin qui contactera le promoteur de la recherche.

Nous acceptons que seuls les médecins ou scientifiques impliqués dans le déroulement de cette étude, ainsi que le représentant des Autorités de Santé, aient accès aux données qui concernent notre enfant dans le respect le plus strict de la confidentialité.

Nous autorisons le Dr.....à effectuer ou faire effectuer les analyses prévues pour cette étude et nous acceptons que des échantillons puissent être conservés congelés pour la constitution d'une collection biologique. Nous acceptons que ces échantillons puissent servir à des études ultérieures.

Toute autre exploration que celles prévues pour cette étude doit faire l'objet d'un nouvel assentiment de notre part. Nous pourrions à tout moment réviser notre position et demander que la lignée cellulaire issue du prélèvement de peau qui a été fait à notre enfant en vue des analyses génétiques ou l'ADN qui en aura été extrait nous soit restitué, ou soit détruit à notre demande.

Notre consentement ne décharge en rien les organisateurs de la recherche de leurs responsabilités, nous conservons tous nos droits garantis par la loi.

Lorsque cette étude sera terminée, nous serons tenus personnellement informés par le médecin des résultats globaux de cette recherche, dès que ceux-ci seront disponibles.

Si nous le souhaitons, les résultats des examens de notre enfant et de l'étude nous seront communiqués directement, conformément à la loi du 4 mars 2002 (article L1111-7).

Avec son consentement, nous acceptons librement que notre enfant participe à cette recherche dans les conditions précisées dans la lettre d'information.

Fait à, le.....
le

Fait à,

Signature :

Signature:

Merci de faire précéder votre signature de la mention manuscrite "*Lu, compris et approuvé*" et d'apposer votre paraphe sur chacune des pages.

Je soussigné, Dr, certifie avoir communiqué toutes informations utiles concernant cette étude. Je m'engage à faire respecter les termes de ce consentement, conciliant le respect des droits et des libertés individuelles et les exigences d'un travail scientifique.

Fait àle.....

Signature :

Un exemplaire de ce formulaire de consentement sera conservé par chaque signataire et par le promoteur.

ANNEXE 4: Notice d'information pour les enfants en âge de comprendre

ARPEGE : Analyse de la Radiosensibilité individuelle en oncologie PÉdiatrique dans l'interrégion Grand-Est

Promoteur : Institut de Cancérologie de Lorraine

6 Avenue de Bourgogne CS 30519 – 54519 Vandoeuvre-lès-Nancy

Investigateurs-Coordonnateurs :

Drs Valérie BERNIER & Guillaume VOGIN

Institut de Cancérologie de Lorraine

Département de radiothérapie

6 Avenue de Bourgogne CS 30519 – 54519 Vandoeuvre-lès-Nancy

Madame, Mademoiselle, Monsieur

Le médecin qui vous prend en charge, vous propose de participer à cette évaluation dans le cadre d'une étude clinico-biologique menée à l'Institut de Cancérologie de Lorraine.

Avant de vous décider à participer à cette étude, il est important que vous en compreniez les objectifs. Ce document a été conçu afin de vous donner des informations détaillées sur cette étude. Vous êtes libre de discuter votre participation avec les membres de votre famille, vos amis ou votre médecin traitant. Vous pouvez poser toutes les questions qui pourraient vous venir à l'esprit au médecin qui vous a proposé de participer à l'étude.

➤ **Quel est l'objectif de l'étude ?**

L'équipe médicale en charge de votre santé a estimé qu'un traitement par radiothérapie (RT) pourrait s'avérer nécessaire. Ce traitement exploite la propriété des radiations ionisantes à détruire les cellules cancéreuses. Environ 200 000 patients dont 900 enfants sont traités par RT chaque année en France.

Tout être vivant possède une certaine capacité à réparer plus ou moins bien les dommages causés par les radiations ionisantes au niveau de ses cellules. Ces radiations, avant d'interagir avec la tumeur, traversent une certaine épaisseur d'organes en bonne santé appelés "organes à risque". Ces organes peuvent réagir durant ou peu après l'irradiation thérapeutique ce qui peut être à l'origine d'effets secondaires attendus et temporaires qui vous seront explicités par votre radiothérapeute. Toutefois, comme avec tout traitement, des séquelles à plus ou moins long terme peuvent être observées chez moins de 10% des patients sans possibilité de les prévenir pour le moment.

Notre équipe cherche à valider chez l'enfant un test permettant d'expliquer pourquoi certains individus présentent des réactions inhabituelles aux rayons et de prévenir ces réactions. Ce dernier est réalisé à partir d'un prélèvement de peau de petite taille. Il s'agit d'étudier la proportion d'enfants plus sensibles aux radiations au sein de l'ensemble des enfants pris en charge dans les services de radiothérapie du Grand Est de la France sur deux années. A terme, il s'agirait de délivrer une dose de rayons adaptée à la sensibilité de chaque enfant, afin d'augmenter les chances de guérison et d'éviter les toxicités.

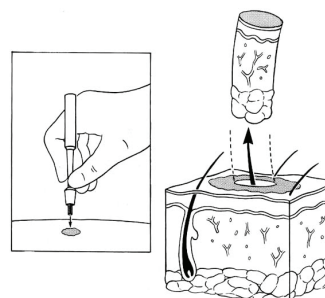
➤ **Qu'est-ce que votre participation à l'étude implique pour vous ?**

En participant à cette étude, vous acceptez que les données médicales vous concernant soient recueillies et analysées. Votre traitement ainsi que votre prise en charge globale sera classique pour ce type de pathologie que vous acceptiez ou non de participer à l'étude.

Afin de faire progresser la connaissance, les résultats de cette étude associés à ceux d'autres malades feront l'objet d'analyses comparatives et seront publiés dans des revues scientifiques spécialisées sous forme totalement anonyme concernant les personnes à l'origine des prélèvements.

➤ **Quel est le déroulement de l'étude ?**

Avant de commencer la RT, une très petite quantité de cellules sera prélevée au niveau de votre peau (2 mm de diamètre et environ 2 mm de profondeur, au niveau de la fesse). Ces prélèvements ne laisseront qu'une infime cicatrice sur votre corps et seront réalisés dans des conditions d'asepsie classiques et dans la mesure du possible au cours d'une anesthésie générale programmée pour d'autres objectifs. Dans le cas contraire, ils seront réalisés sous anesthésie locale (MEOPA ; crème EMLA) associée éventuellement à d'autres mesures antalgiques selon les pratiques des centres.



Le prélèvement sera réalisé soit lors du bilan initial, soit avant de débiter la RT. Il sera envoyé à l'Institut de Cancérologie de Lorraine où il sera mis en culture. Les lignées seront ensuite expédiées au Groupe de Radiobiologie CRU 1052 de l'INSERM à Lyon pour réaliser le test mentionné précédemment à différents moments du processus de réparation cellulaire. Au préalable les échantillons cellulaires seront irradiés au moyen d'un appareil de RT conventionnel avec lequel vous serez traité. Cette délocalisation est liée au caractère hautement spécialisé de cette équipe et à son équipement d'un microscope à fluorescence dédié.

Les traitements par CT et RT se dérouleront selon les modalités habituelles définies par les protocoles de recherche (inter)nationaux dont vous dépendez. Ce traitement sera prolongé par une surveillance au long cours, classique, et ne comportant aucun examen supplémentaire découlant de cette étude.

➤ **Combien de personnes participeront à cette étude ?**

157 patients participeront à cette étude.

➤ **Quelle est la durée de votre (la) participation (de votre enfant) à cette étude ?**

Vous êtes inclus au moment du diagnostic dès lors qu'une indication potentielle de RT pour traiter localement la tumeur est posée collégalement par l'équipe médicale. Le cas échant, vous débuterez alors la chimiothérapie selon les recommandations en vigueur pour votre pathologie. La biopsie de peau sera réalisée au moment du diagnostic médical.

Dans le cas où votre traitement ne requiert pas de chimiothérapie, la biopsie de peau sera réalisée avant de débiter la RT. Dans le cas où votre traitement requiert de la CT, la biopsie sera effectuée :

- Avant cette dernière si l'indication de RT est déjà posée.
- A l'issue de la CT et avant de débiter la RT si l'indication de RT est incertaine au diagnostic,

Dans certains cas, l'indication de RT n'est posée que tardivement qu'en cas de réponse insuffisante de la tumeur à la chimiothérapie. Si vous n'avez pas besoin de RT, vous serez sorti de cette étude puisque l'analyse de la sensibilité aux rayons n'a plus d'intérêt.

Pendant la RT, vous serez reçu une fois par semaine par le radiothérapeute qui évaluera la façon dont votre organisme tolère le traitement. A trois mois, puis une fois/an vous serez reconvoqué(e) par les médecins pour apprécier la toxicité retardée au traitement, tel que prévu par les recommandations professionnelles classiques s'appliquant à la tumeur dont vous souffrez

➤ **Quels sont les risques possibles ?**

Il s'agit d'une étude sans bénéfice individuel direct

➤ **Quels sont les risques possibles ?**

Les biopsies de peau sont un acte sans danger, réalisé sous anesthésie et ne laissant qu'une minime cicatrice visible, de la taille du cylindre utilisé pour la biopsie (2mm). Le risque d'infection locale et de saignement est faible et facilement contrôlé par des mesures locales simples. Enfin, il est possible de constater une réaction allergique locale et banale au pansement adhésif. A plus long terme, certains individus peuvent développer indépendamment de leur cancer une cicatrice excessive appelée chéloïde. Cette cicatrice pouvant être disgracieuse, elle peut être corrigée par des mesures réparatrices généralement simples.

➤ **Vos droits**

Vous n'êtes en aucun cas obligé(e) de prendre part à l'étude. Un refus de participation ne modifiera en aucune façon vos rapports avec l'équipe médicale qui vous a pris en charge, et la qualité de vos soins n'en sera nullement affectée. Aussi, nous vous demandons, si vous consentez à participer à l'étude, de signer le formulaire joint à ce document d'information. Vous pouvez refuser ou, en cas d'acceptation, retirer votre consentement à tout moment sans avoir à expliquer votre choix.

Les informations vous concernant sont strictement confidentielles et anonymisées. Votre dossier médical restera confidentiel et ne pourra être consulté que sous la responsabilité du médecin s'occupant de votre traitement. Peuvent aussi consulter votre dossier les autorités de santé et les personnes dûment mandatées par l'organisateur de la recherche. Toutes sont soumises au secret professionnel.

Conformément aux dispositions de Loi relative à l'informatique et aux libertés (Loi n°78-17 du 6 janvier 1978 modifiée par la loi n°2004-801 du 6 août 2004), vous disposez d'un droit d'accès, de rectification des données vous concernant et d'opposition à la transmission de ces données. Ce droit s'exerce auprès de votre médecin qui seul connaît votre identité.

De plus selon les dispositions de la loi n° 2002-303 du 4 mars 2002 relative aux droits des malades, vous serez informé, à votre demande, des résultats globaux de l'étude par l'investigateur.

Cette étude est réalisée conformément aux dispositions du Code de la Santé Publique relatives aux recherches biomédicales. Dans ce cadre, elle a reçu :

- Un avis favorable du Comité de Protection des Personnes (CPP) Est III en date du
- Une autorisation auprès de l'ANSM en date du

Le promoteur a souscrit une assurance garantissant sa responsabilité civile pour couvrir les éventuelles conséquences préjudiciables de cette étude (NOM A PRECISER).

➤ **Des questions ?**

L'étude est menée dans votre établissement de soins sous la responsabilité du Dr Guillaume VOGIN. Celui-ci reste à votre disposition pour vous donner les renseignements et explications complémentaires que vous souhaitez à l'occasion des consultations prévues pendant et après la période de traitement. N'hésitez pas à reprendre rendez-vous si vous avez besoin d'autres informations.

Consentement patient

ARPEGE : Analyse de la Radiosensibilité individuelle en oncologie PÉdiatrique dans l'interrégion Grand-Est

Investigateurs coordonnateurs : Drs V. Bernier & G. Vogin

Promoteur : Institut de Cancérologie de Lorraine

Projet soutenu par la Société Française des Cancers de l'Enfant (SFCE)

Version n°1 du 11 Février 2014

Je soussigné,

Madame/Monsieur.....(no
m, prénom), né le.....,
adresse.....

.....
...certifie avoir lu et compris le document d'information qui m'a été remis, et j'accepte de
participer à l'étude **ARPEGE : Analyse de la Radiosensibilité individuelle en oncologie
PÉdiatrique dans l'interrégion Grand-Est.**

ARPEGE a reçu en ce sens un avis favorable du Comité (nom exact du Comité et date) et
de l'autorisation de l'autorité compétente (nom et date). **nom et coordonnées de l'assureur
et numéro du contrat.**

J'ai connaissance :

- Des objectifs et des désagréments pouvant résulter du prélèvement d'une biopsie de peau et d'échantillon(s) sanguin(s) afin d'étudier les capacités de réparation des cellules.
- Que je recevrais un traitement par radiothérapie et chimiothérapie selon les recommandations de bonnes pratiques en vigueur.

Des informations orales et écrites (lettre d'information) m'ont été données. J'ai eu la
possibilité de poser toutes les questions que nous souhaitons au
Dr.....

J'ai bénéficié d'un temps de réflexion suffisant entre ces informations et le présent
consentement.

J'ai connaissance de la possibilité qui m'est réservée d'interrompre ma participation à cette
étude à tout moment sans avoir à justifier ma décision et je ferai mon possible pour en
informer le médecin qui me suit dans le cadre de cette recherche le Dr
.....

Cela ne remettra pas en cause la qualité de mes soins ultérieurs.

Je suis affilié ou bénéficie du régime de sécurité sociale comme l'exige la loi.

J'accepte que les données enregistrées à l'occasion de cette recherche comportant des données génétiques éventuelles, la date de naissance complète, commune de naissance, commune de résidence, sexe, origine ethnique, données cliniques dont éventuellement des données anciennes sur ma maladie, données de traitements, résultats d'analyses biologiques et génétiques puissent faire l'objet d'un traitement informatisé par le promoteur ou pour son compte.

Si mon diagnostic a été porté avant le début de l'étude j'accepte que les données anciennes concernant l'histoire de ma maladie soient également recueillies.

J'ai noté que le droit d'accès prévu par la loi du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés (article 39) s'exerce à tout moment auprès du médecin qui me suit dans le cadre de la recherche et qui connaît mon identité.

Je peux exercer mon droit de rectification et d'opposition auprès de ce même médecin qui contactera le promoteur de la recherche.

J'accepte que seuls les médecins ou scientifiques impliqués dans le déroulement de cette étude, ainsi que le représentant des Autorités de Santé, aient accès aux données qui me concernent dans le respect le plus strict de la confidentialité.

Nous autorisons le Dr.....à effectuer ou faire effectuer les analyses prévues pour cette étude et j'accepte que des échantillons puissent être conservés congelés pour la constitution d'une collection biologique. J'accepte que ces échantillons puissent servir à des études ultérieures.

Toute autre exploration que celles prévues pour cette étude doit faire l'objet d'un nouvel assentiment de ma part. Je peux à tout moment réviser ma position et demander que la lignée cellulaire issue du prélèvement de peau qui m'a été fait en vue des analyses génétiques ou l'ADN qui en aura été extrait nous soit restitué, ou soit détruit à notre demande.

Mon consentement ne décharge en rien les organisateurs de la recherche de leurs responsabilités, je conserve tous mes droits garantis par la loi.

Lorsque cette étude sera terminée, je serais tenu personnellement informé par le médecin des résultats globaux de cette recherche, dès que ceux-ci seront disponibles.

Si je le souhaite, les résultats de mes examens et de l'étude me seront communiqués directement, conformément à la loi du 4 mars 2002 (article L1111-7).

J'accepte librement de participer à cette recherche dans les conditions précisées dans la lettre d'information.

Fait à, le.....

Signature :

Merci de faire précéder votre signature de la mention manuscrite "*Lu, compris et approuvé*" et d'apposer votre paraphe sur chacune des pages.

Je soussigné, Dr, certifie avoir communiqué toutes informations utiles concernant cette étude. Je m'engage à faire respecter les termes de ce consentement, conciliant le respect des droits et des libertés individuelles et les exigences d'un travail scientifique.

Fait àle.....

Signature :

Un exemplaire de ce formulaire de consentement sera conservé par chaque signataire et par le promoteur.

ANNEXE 5: Notice d'information pour les enfants

(à lire à voix haute ou à faire lire par l'enfant après explication orale)

ARPEGE : Analyse de la Radiosensibilité individuelle en oncologie PÉdiatrique dans l'interrégion Grand-Est

Promoteur : Institut de Cancérologie de Lorraine

6 Avenue de Bourgogne CS 30519 – 54519 Vandoeuvre-lès-Nancy

Investigateurs-Coordonnateurs :

Drs Valérie BERNIER & Guillaume VOGIN

Institut de Cancérologie de Lorraine

Département de radiothérapie

6 Avenue de Bourgogne CS 30519 – 54519 Vandoeuvre-lès-Nancy

Tu es venu voir le médecin car tu risques d'avoir besoin de rayons pour traiter ta maladie.

Ces rayons vont traverser ton corps avant d'atteindre la tumeur restante.

Parfois certains enfants sont malades à cause de l'effet de ces rayons sur les organes en bonne santé traversés et on ne comprend pas assez bien pourquoi. Cette question est très importante car on pourrait à l'avenir donner une dose de rayons différente à chaque enfant.

A l'Hôpital où tu es venu, nous recherchons des réponses à cette question et développons un test pour permettre de désigner les enfants qui auront les plus de difficultés à cicatriser. Pour cela, nous proposons aux enfants traités comme toi de participer à une étude. Tu seras suivi de la même façon que tous les enfants qui ont la même maladie que toi. Mais en plus, avant que tu commences les rayons et éventuellement la chimio, on devra te prendre un petit morceau de peau de la taille d'un grain de riz au niveau de la fesse. Ta peau sera endormie et donc tu ne devrais pas avoir mal ni saigner beaucoup. Tu ne seras pas recousu et il ne restera au pire qu'une minuscule cicatrice.

Nous avons discuté avec tes parents de cette étude. Tu peux en parler avec eux et nous poser toutes les questions que tu souhaites.

Serais-tu d'accord pour aider les médecins à répondre aux questions qu'ils se posent et aider ainsi les autres enfants à l'avenir ?

Comme ton papa et ta maman, tu es libre d'accepter ou de refuser.

Donne ta réponse en remplissant la partie ci-dessous (tes parents peuvent t'aider).

Je m'appelle

Le Docteur m'a proposé de me faire faire un
prélèvement de peau pour mieux comprendre ma maladie et m'a expliqué à quoi il servira.

Entoure la phrase correspondant à ton choix :

- J'accepte que l'on me prenne un petit bout de peau
- Je refuse que l'on me prenne un petit bout de peau

Date :.....

Signature facultative de l'enfant

Nom du Médecin qui a donné l'information :

Date :.....

Signature du Médecin

Glossaire :

Annexe 6 – Critères de toxicité (CTCAE)

Se référer à l'échelle d'évaluation de la toxicité CTCAE qui est joint séparément et que l'on peut télécharger sur le site du NCI



Cancer Therapy Evaluation Program

<http://ctep.cancer.gov/>

Common Terminology Criteria for Adverse Events v4.0 (CTCAE)

(Publish Date)

Annexe 7A - Notification d'un Evénement Indésirable Grave Attendu - EIG-A

A faxer au 03 83 59 83 59

N° EUDRACT :		N° Protocole :		Pays :	
<input type="checkbox"/> Rapport initial		<input type="checkbox"/> Rapport de suivi n°: __		Centre investigateur :	
1. INFORMATIONS PATIENT					
N° inclusion : __		Nom (3 lettres) : __		Prénom (2 lettres) : __	
Date de naissance : __ / __ / __		Sexe : <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> M		Poids (kg) : __	
Taille (cm) : __		Bras de traitement : __			
2. INFORMATIONS SUR L'ÉVÉNEMENT					
Date de survenue événement : __ / __ / __				Toxicité (grade NCI – CTC V3) : <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5	
Sortie d'essai <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non si oui, date __ / __ / __					
Diagnostic ou principaux symptômes.....					
3. TYPE D'ÉVÉNEMENT					
<input type="checkbox"/> Décès date __ / __ / __		<input type="checkbox"/> Invalidité / Incapacité temporaire ou permanente			
<input type="checkbox"/> Mise en jeu du pronostic vital		<input type="checkbox"/> Autre cancer :			
<input type="checkbox"/> Hospitalisation (> 24h) ou prolongation d'hospitalisation) date __ / __ / __		<input type="checkbox"/> Anomalie congénitale ou malformation fœtale			
<input type="checkbox"/> Médicalement significatif, préciser.....					
4. ÉVOLUTION					

Evénement en cours
 Décès en relation avec l'événement
 Résolution sans séquelle, date ____/____/____
 Décès sans rapport avec l'événement
 Résolution avec séquelles, date ____/____/____
 Inconnu
 Date de fin d'hospitalisation : ____/____/____
 Nature des séquelles :

5. TRAITEMENTS A L'ESSAI

	VOIE	DATES		DOSES ET UNITES		IMPUTABILITE
		Dates de traitement avant apparition de l'événement	Dernière dose administrée	Dose cumulative depuis la 1 ^{ère} administration		
1.		Du ____/____/____ au ____/____/____				1 : Exclu 2 : Douteux 3 : Plausible 4 : Vraisemblable 5 : Très vraisemblable 6 : Ne peut conclure
2.		Du ____/____/____ au ____/____/____				
3.		Du ____/____/____ au ____/____/____				
4.		Du ____/____/____ au ____/____/____				
5.		Du ____/____/____ au ____/____/____				

<p>Un ou des traitements ont-ils été arrêtés ?</p> <input type="checkbox"/> Oui N° ____ N° ____ N° ____ N° ____ <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> NA <p>Disparition de l'événement après arrêt d'un ou des produits ?</p> <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> NA	<p>Un ou des traitements ont-ils été réintroduits ?</p> <input type="checkbox"/> Oui N° ____ N° ____ N° ____ N° ____ <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> NA <p>Réapparition de l'événement après réintroduction ?</p> <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> NA
--	--

6. IMPUTABILITE GLOBALE (Selon vous, cet événement est plutôt lié)

au(x) traitement(s) de l'essai (préciser le(s) nom(s) des traitements)
 à la progression de la maladie
 au protocole de l'essai
 autre(s) maladie(s) concomitante(s)

<input type="checkbox"/> autre(s) traitement(s) concomitant(s)	<input type="checkbox"/> autre(s):.....
7. NOTIFICATEUR	
Nom et fonction du notificateur :	Date _ _ / _ _ / _ _
Etablissement :	Signature de l'investigateur/co-investigateur
Adresse :	
Tél. :	
Fax :	
E-mail :	

Annexe 7B – Notification d'un Evénement Indésirable Grave Inattendu - EIG-I

A faxer au 03 83 59 83 59

N° EUDRACT :	N° Protocole :	Pays :	
<input type="checkbox"/> Rapport initial	<input type="checkbox"/> Rapport de suivi n°: _ _	Centre investigateur :	
1. INFORMATIONS PATIENT			
N° inclusion : _ _ _	Nom (3 lettres) : _ _ _	Prénom (2 lettres) : _ _	Date de naissance : _ _ / _ _ / _ _ _
Sexe : <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> M	Poids (kg) : _ _ _	Taille (cm) : _ _ _	Bras de traitement : _ _
2. INFORMATIONS SUR L'EVENEMENT			
Date de survenue événement : _ _ / _ _ / _ _		Toxicité (grade NCI – CTC V3) : <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5	
Sortie d'essai <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non si oui, date _ _ / _ _ / _ _			
Diagnostic ou principaux symptômes.....			
3. TYPE D'EVENEMENT			
<input type="checkbox"/> Décès date _ _ / _ _ / _ _		<input type="checkbox"/> Invalidité / Incapacité temporaire ou permanente	
<input type="checkbox"/> Mise en jeu du pronostic vital		<input type="checkbox"/> Autre cancer :	

Hospitalisation (> 24h) ou prolongation d'hospitalisation) date |_|_| / |_|_| / |_|_| Anomalie congénitale ou malformation foetale

Médicalement significatif, préciser.....

4. ÉVOLUTION

Événement en cours Décès en relation avec l'événement
 Résolution sans séquelle, date |_|_| / |_|_| / |_|_| Décès sans rapport avec l'événement
 Résolution avec séquelles, date |_|_| / |_|_| / |_|_| Inconnu
 Date de fin d'hospitalisation : |_|_| / |_|_| / |_|_|

Nature des séquelles :.....

5. TRAITEMENTS (compléter le tableau ci-après en page 2/2)

6. TRAITEMENT DE L'ÉVÉNEMENT INDÉSIRABLE

Traitement	Dose/Unité	Voie	Indication	Date début	Date fin	En cours
.....			_ _ / _ _ / _ _	_ _ / _ _ / _ _	<input type="checkbox"/>
.....			_ _ / _ _ / _ _	_ _ / _ _ / _ _	<input type="checkbox"/>
.....			_ _ / _ _ / _ _	_ _ / _ _ / _ _	<input type="checkbox"/>

7. MÉDICATION CONCOMITANTE PERTINENTE (à l'exclusion de celle utilisée pour traiter l'événement)

Traitement	Dose/Unité	Voie	Indication	Date début	Date fin	En cours	Relation causale		
							oui	non	pos-sible
.....			_ _ / _ _ / _ _	_ _ / _ _ / _ _	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....			_ _ / _ _ / _ _	_ _ / _ _ / _ _	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....			_ _ / _ _ / _ _	_ _ / _ _ / _ _	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

8. ANTÉCÉDENTS MÉDICAUX PERTINENTS ET/OU MALADIE(S) CONCOMITANTE(S)

.....

9. IMPUTABILITE GLOBALE (Selon vous, cet événement est plutôt lié)

au(x) traitement(s) de l'essai (préciser le(s) nom(s) des traitements)..... à la progression de la maladie
 au protocole de l'essai autre(s) maladie(s) concomitante(s)
 autre(s) traitement(s) concomitant(s) autre(s).....

10. NOTIFICATEUR

Nom et fonction du notificateur :

Etablissement :

Adresse :

Tél. :

Fax :

E-mail :

Date |_|_| / |_|_| / |_|_|

Signature de l'investigateur/co-investigateur

Complément d'information d'un Evénement Indésirable Grave Inattendu (suite)

N° Protocole :		N° EudraCT :			N° Patient :				
5. TRAITEMENTS									
	V O I E	DATES		DOSES ET UNITES		MODIFICATIONS DE TRAITEMENTS	TRAITEMENTS		
		Dates de traitement avant apparition de l'événement		Dernière dose administrée	Dose cumulative depuis la 1 ^{ère} adm.		(1) Réduction de dose	(2) Interruption temporaire	(3) Interruption définitive
.....		Du __ _ _ _ _ _ _ _	Au __ _ _ _ _ _ _ _	_ _ _ _ _	_ _ _ _ _	_ _ _ _ _ _ _ _ Date	_ _ _ _ _ _ _ Date	_ _ _ _ _ _ _ Dose : _ _ _ _	_ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _
.....		Du __ _ _ _ _ _ _ _	Au __ _ _ _ _ _ _ _	_ _ _ _ _	_ _ _ _ _	_ _ _ _ _ _ _ _ Date	_ _ _ _ _ _ _ Date	_ _ _ _ _ _ _ Dose : _ _ _ _	_ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _
.....		Du __ _ _ _ _ _ _ _	Au __ _ _ _ _ _ _ _	_ _ _ _ _	_ _ _ _ _	_ _ _ _ _ _ _ _ Date	_ _ _ _ _ _ _ Date	_ _ _ _ _ _ _ Dose : _ _ _ _	_ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _
.....		Du __ _ _ _ _ _ _ _	Au __ _ _ _ _ _ _ _	_ _ _ _ _	_ _ _ _ _	_ _ _ _ _ _ _ _ Date	_ _ _ _ _ _ _ Date	_ _ _ _ _ _ _ Dose : _ _ _ _	_ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _

							Date	_____	
.....		Du _____ _____	Au _____ _____	_____ _____	_____ _____	_____ _____	_____ _____	_____ _____	_____ _____
.....							Date		
...							Date	Dose : _____	
.....		Du _____ _____	Au _____ _____	_____ _____	_____ _____	_____ _____	_____ _____	_____ _____	_____ _____
.....							Date		
...							Date	Dose : _____	
NARRATIF									
.....									
.....									
.....									
.....									
.....									

SPECIMEN