

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 418 : DE CANCÉROLOGIE

Laboratoire de Radiobiologie et Oncologie

**REDACTION FRANÇAIS DE LA THÈSE DE DOCTORAT
en**

ONCOLOGIE

par

Grace SHIM

Influence de la radiosensibilité individuelle sur les réponses biologiques à des rayonnements ionisants, l'estimation de la dose, et le rôle de maintenance des télomères

Date de soutenance : 30 septembre 2015

Composition du jury :

Directeur de thèse :	Laure SABATIER	CEA, Fontenay-aux-Roses, France
Co-directeur de thèse :	Edouard AZZAM	Rutgers University, Newark, NJ, USA
Rapporteurs :	Dietrich AVERBECK Elena GIULOTTO	CEA / IRSN, Fontenay-aux-Roses, France Università di Pavia, Pavia, Italy
Examineurs :	Michel BOURGUIGNON Christophe BADIE	IRSN, Fontenay-aux-Roses, France Public Health England, London, UK

RESUME

L'exposition aux rayonnements ionisants est une composante inévitable de la vie moderne. Il est bien établi qu'il existe une grande variabilité inter-individuelle de la radiosensibilité chez les individus sains et chez des patients atteints de cancer. Cependant, les mécanismes impliqués dans l'hétérogénéité des réponses biologiques radio-induites ne sont pas encore bien compris, et une approche biologique permettant d'établir de façon fiable le niveau de radiosensibilité reste à développer. Dans cette thèse, nous avons étudié l'ampleur et l'impact de la radiosensibilité individuelle chez les individus sains dans les contextes de dosimétrie d'urgence et de radiothérapie. Nous avons également examiné les différents rôles des télomères dans la prédiction de la radiosensibilité individuelle et des risques pour la santé humaine à long terme (spécifiquement, en ce qui concerne les maladies cardiovasculaires et/ou les cancers) après irradiation. Tout d'abord, dans le contexte de la dosimétrie dans le cas d'une situation d'urgence (lorsqu'il est nécessaire d'estimer rapidement la dose d'irradiation reçue par un individu), nous avons démontré que l'impact de la radiosensibilité individuelle peut être négligeable en utilisant des mesures globales de fluorescence de γ H2AX via cytométrie en flux dans des fibroblastes humains et des lymphocytes à 4 heures après exposition ; cette méthode peut être un outil de biodosimétrie efficace et rapide qui peut aider au tri des personnes irradiées dans une situation d'urgence basées sur les niveaux individuels d'exposition. Dans un second temps, nous avons étudié l'ampleur et l'influence de la radiosensibilité individuelle sur l'induction d'aberrations chromosomiques après une irradiation de 2 Gy de rayons γ , correspondant à une fraction de radiothérapie conventionnelle, dans les lymphocytes d'individus sains. Pour ces analyses, nous définissons la radiosensibilité individuelle par rapport à la fréquence des cassures double-brin (CDB) radio-induite, qui ont été calculées à partir de la quantification des aberrations chromosomiques visualisées par hybridation *in situ* des télomères et centromères (TC-FISH). Ce marquage améliore et simplifie la technique « gold standard » de dosimétrie biologique (la quantification des chromosomes dicentriques). Nous avons également estimé la radiosensibilité individuelle à l'irradiation carbone, ions lourds utilisés en radiothérapie, et l'efficacité biologique relative (EBR) des ions carbone par rapport à une irradiation γ . Nous avons fourni des courbes dose-réponse pour ces deux types d'irradiations en fonction de la fréquence des CDB radio-induite par exposition à une gamme de doses. De plus, nous avons estimé l'EBR d'un troisième type de rayonnement également utilisé en radiothérapie d'ions lourds (protons) par rapport à une irradiation γ , et nous avons comparé la radiosensibilité individuelle de ces trois types d'irradiation avec énergies différentes. Ensuite, nous avons évalué les rôles des télomères et de leur maintien pour la prédiction de la radiosensibilité individuelle. Nous avons constaté que la longueur moyenne

des télomères, en combinaison avec leurs modifications radio-induites, peuvent être un bon prédicteur de la radiosensibilité individuelle. Enfin, nous avons montré comment les télomères pourraient être liés à des risques sanitaires à long terme après une irradiation: nous avons démontré que le raccourcissement des télomères pouvait être un nouveau facteur de prédiction de maladies cardiovasculaires après radiothérapie, et nous avons discuté par la suite, les télomères comme des acteurs clés dans le processus de cancérogenèse radio-induite. En conclusion, nous proposons un modèle présentant la façon dont les télomères pourraient jouer un rôle crucial dans ces deux pathologies radio-induite, et nous délibérons des relations entre le maintien des télomères, les effets biologiques radio-induites, et la radiosensibilité individuelle.

Mots clefs: Rayonnements ionisants, radiosensibilité individuelle, maintenance des télomères, efficacité biologique relative, biodosimétrie, cytogénétique

LISTE DES PUBLICATIONS ORIGINAUX INCLUS DANS CETTE THESE

- 1) Viau M^a, Testard I^a, **Shim G^a**, Morat L, Normil MD, Hempel WM, Sabatier L. *Global quantification of γ H2AX as a triage tool for the rapid estimation of received dose in the event of accidental radiation exposure.* Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2015; **in press**. [anglais]
 ^a co-first authors.
- 2) M'kacher R, Girinsky T, Colicchio B, Ricoul M, Dieterlen A, Jeandidier E, Heidingsfelder L, Cuceu C, **Shim G**, Frenzel M, Lenain A, Morat L, Bourhis J, Hempel WM, Koscielny S, Paul JF, Carde P, Sabatier L. *Telomere shortening: a new prognostic factor for cardiovascular disease post-radiation exposure.* Radiation Protection Dosimetry. 2015; 164 (1-2): 134-137. doi: 10.1093/rpd/ncu296. [anglais]
- 3) **Shim G**, Ricoul M, Hempel WM, Azzam EI, Sabatier L. *Crosstalk between telomere maintenance and radiation effects: A key player in the process of radiation-induced carcinogenesis.* Mutation Research/Reviews in Mutation Research. 2014; 760: 1-17. doi: 10.1016/j.mrrev.2014.01.001. [anglais]
- 4) de Toledo SM, Buonanno M, Li M, Asaad N, Qin Y, Gonon G, **Shim G**, Galdass M, Boateng Y, Zhang J, Azzam EI. *The impact of adaptive and non-targeted effects in the biological responses to low dose/low fluence ionizing radiation: the modulating effect of linear energy transfer.* Health Physics. 2011; 100 (3): 290-292. doi: 10.1097/HP.0b013e31820832d8. [anglais]
- 5) Zhang J, Buonanno M, Gonon G, Li M, Galdass M, **Shim G**, de Toledo SM, Azzam EI. (2012) *Bystander effects and adaptive responses modulate in vitro and in vivo biological responses to low dose ionizing radiation*, in Mothershill CE, Korogodina V, Seymour CB (Ed.), *Radiobiology and environmental security*, Springer, Netherlands. [anglais]
- 6) Frenzel M, Cuceu C, **Shim G**, Ricoul M, Sabatier L. (2014) *Telomere*, in H.V. Krieken (Ed.), *Encyclopedia of Pathology*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. [anglais]
- 7) Pottier G, Viau M, Ricoul M, **Shim G**, Bellamy M, Cuceu C, Hempel WM, Sabatier L. *Lead exposure induces telomere instability in human cells.* PLoS One. 2013; 8 (6): e67501. [anglais]

TABLE DES MATIERES

RESUME	2
LISTE DES PUBLICATIONS ORIGINAUX INCLUS DANS CETTE THESE	4
TABLE DES MATIERES	5
LISTE DES FIGURES	6
AVANT-PROPOS	7
1 - INTRODUCTION	8
2 - RADIOSENSIBILITE INDIVIDUELLE ET ESTIMATION DE LA DOSE EN CAS DE DOSIMETRIE D'URGENCE	10
3 - RADIOSENSIBILITE INDIVIDUELLE ET REACTIONS DES TISSUS NORMAUX CHEZ LES INDIVIDUS SAINS	12
3.1 Radiosensibilité individuelle aux rayons γ	12
3.2 Comparaison de la radiosensibilité individuelle après exposition aux rayons γ et aux ions carbone	14
3.3 Radiosensibilité individuelle après exposition aux protons et effet de l'énergie des rayonnements ionisant sur la radiosensibilité	16
4 - ROLE DES LONGUEURS DES TELOMERES ET DE LEUR MAINTIEN SUR LA RADIOSENSIBILITE INDIVIDUELLE	16
4.1 Variations individuelles intrinsèques de la longueur des télomères et de l'instabilité télomérique	16
4.2 La longueur des télomères comme un prédicteur de la radiosensibilité à l'irradiation γ à court terme	17
5 - ROLE DE TELOMERES DANS DES RISQUES POUR LA SANTE HUMAINE A LONG TERME APRES IRRADIATION	18
5.1 La longueur des télomères comme un prédicteur de maladies cardiovasculaires	18
5.2 Les télomères comme acteurs clés dans le processus de la cancérogenèse radio-induite	19
6 - DISCUSSION ET CONCLUSIONS	21
6.1 Les télomères comme acteurs clés dans le processus de cancérogenèse radio-induite et maladies cardiovasculaires, et l'influence de la radiosensibilité individuelle	21
6.2 Les télomères et leur maintien comme prédicteur de la radiosensibilité individuelle	25
BIBLIOGRAPHIE	30

LISTE DES FIGURES

Figure S-1 (Figures 3C et 5C dans notre article (Viau, Testard, Shim et al., 2015, sous presse)). Les 3 catégories proposé de tri en utilisant la quantification de l'intensité globale de fluorescence de γ H2AX par cytométrie en flux dans des fibroblastes humains et des lymphocytes 4 heures après irradiation: la population asymptomatique ou non-affecté nécessitant un minimum de soins (sections verte), la population présentant des symptômes modérés qui ne nécessitent pas de soins médicaux immédiats (sections jaune), et de la population qui doit être hospitalisé (sections rouge).....	12
Figure S-2 (Figure 1 dans notre article (M'Kacher et al., 2015)). Les comparaisons des longueurs de télomères des lymphocytes du sang périphérique de patients atteints de lymphome Hodgkin atteints de maladies cardiovasculaires (par angiographie coronaire par tomodensitométrie anormale) par rapport aux patients sans maladie cardiovasculaire évidente. Les patients atteints de maladies cardiovasculaires ont raccourcissement significatif des télomères et moins d'hétérogénéité dans la longueur des télomères.	19
Figure S-3 (Figure 3 dan notre article (Shim et al., 2014)). Notre modèle proposé sur l'impact de la hétérogénéité de la longueur des télomères sur les processus de vieillissement cellulaire, la sénescence, la crise, et la carcinogenèse.	20

AVANT-PROPOS

L'exposition aux rayonnements ionisants est une composante inévitable de la vie moderne, en particulier dans l'avènement de la radiologie diagnostique, la radiothérapie, et la technologie nucléaire militaire/civile. Il est bien établi qu'il existe une grande variabilité inter-individuelle de la radiosensibilité dans la population générale. Comme la radiosensibilité peut avoir un impact significatif sur les effets radio-induits à court terme et à long terme, la compréhension des mécanismes impliqués dans l'hétérogénéité des réponses biologiques aux rayonnements ionisants et le développement d'une approche biologique permettant d'établir de façon fiable le niveau de radiosensibilité, sont essentiels pour améliorer les protocoles de radioprotection, les régimes de radiothérapie, et la santé humaine à long terme après exposition. Dans cette thèse, nous étudions l'ampleur et l'impact de la radiosensibilité individuelle chez les individus sains dans les contextes de dosimétrie d'urgence et de radiothérapie. De plus, nous avons examiné le rôle des télomères dans la prédiction de la radiosensibilité individuelle et des risques pour la santé humaine à long terme (pour ce qui est des maladies cardiovasculaires et / ou cancer) après une exposition aux rayonnements ionisants. Tout d'abord, nous nous sommes demandés si la radiosensibilité individuelle, mesurée par l'induction de γ H2AX (candidat prometteur en tant que biomarqueur pour la biodosimétrie), a un impact significatif sur le développement d'un outil de biodosimétrie efficace et rapide, ceci afin de faciliter le tri des personnes irradiées lors de situations d'urgence. Dans un second temps, nous cherchons à caractériser l'ampleur et l'influence de la radiosensibilité individuelle sur l'induction d'aberrations chromosomiques à une dose de rayons γ correspondant à une fraction de radiothérapie conventionnelle (rayons γ) et d'ions lourds (carbone et protons). Nous définissons également l'efficacité biologique relative (EBR) de ces ions lourds, car cela reste un problème majeur pour l'amélioration de nouvelles techniques de radiothérapie. Pour ces analyses, nous utilisons une version améliorée de la technique « gold standard » de dosimétrie biologique (quantification des chromosomes dicentriques) par hybridation *in situ* des télomères et centromères (TC-FISH), ce qui permet de simplifier et d'améliorer la sensibilité de l'analyse cytogénétique classique. Enfin, nous nous sommes demandés si les télomères et leur maintien peuvent jouer un rôle dans la prédiction de la radiosensibilité individuelle ainsi qu'au niveau des risques pour la santé à long terme après expositions aux rayonnements ionisants (spécifiquement les maladies cardiovasculaires et/ou cancer). Ainsi, au cours de ce manuscrit, nous détaillons la radiosensibilité individuelle chez les individus sains et explorons comment les télomères et leurs modifications radio-induites pourraient influencer cette variabilité et les conséquences sur la santé humaine globale à long terme, post-irradiation.

1 - INTRODUCTION

Dans cette thèse, nous avons étudié la variabilité de réactions de tissus humains normaux dans les contextes de dosimétrie d'urgence (Section 2) et la radiothérapie (Section 3). Nous avons également exploré les rôles des télomères dans la prédiction de ces variations de radiosensibilité (Section 4) et les risques pour la santé humaine à long terme après exposition aux rayonnements ionisants (en particulier, les maladies cardiovasculaires et/ou le cancer; Section 5). En fin de compte, ces résultats peuvent donner un aperçu de l'évaluation de la radiosensibilité individuelle et la santé humaine globale à long terme qui peuvent avoir des implications importantes en biodosimétrie, de la radioprotection, et la radiothérapie.

Le manuscrit anglais de cette thèse présente les résultats et discussions complets, avec des articles déjà publiés inclus si disponibles. Cette rédaction en français résume brièvement les principaux points de la thèse, inclue une figure clé de chacun des articles publiés. Cette rédaction est organisée comme suit:

- Dans la Section 2, nous avons caractérisé l'impact de la radiosensibilité individuelle dans le contexte de biodosimétrie d'urgence. Les résultats et discussion sont présentés dans notre article publié, qui est fourni dans ce chapitre dans le manuscrit anglais: Viau M^ª, Testard I^ª, **Shim G^ª**, et al. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015; sous presse (anglais). ^ª co-premier auteur. Nous avons démontré qu'un outil, peu influencé par les variations de radiosensibilité individuelle, peut être établi en utilisant la quantification globale de γ H2AX dans des fibroblastes humains et des lymphocytes.
- Dans la Section 3, nous avons étudié l'ampleur et l'influence de la radiosensibilité individuelle sur l'induction d'aberrations chromosomiques dans les lymphocytes d'individus sains après irradiation avec des rayons γ , des ions carbone (75 MeV/u), ou des faisceaux de protons (73 MeV et 200 MeV) en utilisant un marquage par hybridation *in situ* des télomères et centromères (TC-FISH). Nous avons déterminons aussi l'efficacité biologique relative (EBR) des ions carbone et des faisceaux de protons (espèces d'ions utilisés en radiothérapie d'ions lourds) par rapport à une irradiation γ .
 - Un article présentant ces résultats est en cours de préparation: **Shim G^ª**, et al. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. manuscrit en préparation (anglais).
- Dans la Section 4, nous avons caractérisé les différences intrinsèques des longueurs des télomères et de leurs niveaux de base de dysfonctionnement dans des lymphocytes du sang périphérique d'individus sains. Nous avons aussi évalué les rôles des télomères

et leur dysfonctionnement radio-induite dans la prédiction de la radiosensibilité individuelle. Ces résultats ne sont pas encore publiés, et ils sont présentés dans leur intégralité dans Section 4 du manuscrit anglais, avec discussions et conclusions dans Section 6.2. Les principaux résultats, discussions, et conclusions sont brièvement résumés dans cette rédaction française.

- Dans la Section 5, nous avons exploré les rôles des télomères risques pour la santé humaine à long terme après irradiation, en se concentrant spécifiquement sur le développement des maladies cardiovasculaires et/ou le processus de cancérogenèse. Dans la Section 5.1, nous avons montré que le raccourcissement des télomères pourrait être un nouveau facteur pronostique de maladie cardiovasculaire après radiothérapie. Les résultats et discussion sont présentés dans notre article publié (M'Kacher et al., 2015). Dans la Section 5.2, nous présentons notre article de revue (Shim et al., 2014) qui traite des relations entre le maintien des télomères et les effets biologiques radio-induits, et proposons un modèle de la façon dont les télomères pourraient être des acteurs clés dans le processus de cancérogenèse radio-induite. Ces articles sont fournis dans ces chapitres dans le manuscrit anglais, et les principaux points sont brièvement résumés dans cette rédaction française.
- Enfin, dans la Section 6, nous avons intégré nos constatations sur la radiosensibilité individuelle et le lien entre le raccourcissement des télomères et les maladies cardiovasculaires dans notre modèle précédemment proposé pour la carcinogenèse radio-induite (Shim et al., 2014). Nous étudions comment les télomères pourraient jouer un rôle important dans le développement des maladies cardiovasculaires et le processus de cancérogenèse radio-induite, et nous proposons comment ces processus peuvent être accélérées en particulier dans les personnes très radiosensibles (Section 6.1). Nous regardons également comment les télomères pourraient prédire la radiosensibilité individuelle (Section 6.2).

2 - RADIOSENSIBILITE INDIVIDUELLE ET ESTIMATION DE LA DOSE EN CAS DE DOSIMETRIE D'URGENCE

Dans le cas d'exposition accidentelle à grande échelle à des rayonnements ionisants, une méthode de biodosimétrie rapide, précise, et pouvant accueillir l'analyse à haut débit est nécessaire pour trier efficacement les victimes en se basant sur les niveaux individuels d'exposition. Peu de temps après l'irradiation aiguë, γ H2AX (la forme phosphorylée de l'histone H2AX) est un candidat prometteur qui pourrait, dans ce cas, être utilisé comme un biomarqueur. Les méthodes manuelles et automatisées pour quantifier γ H2AX sont discutés en détail dans la Section 1.3.5 de cette thèse. Cependant, pour que H2AX puisse être utilisé comme un outil de tri biodosimétrique, les variabilités intra- et inter-individuelles des niveaux de base de γ H2AX doivent être évalués. Il en va de même pour la cinétique de l'induction radio-induite et de sa décroissance après irradiation, qui dépendent de la capacité de réparation des cassures double-brin, et qui peuvent aussi refléter la radiosensibilité individuelle. Ces variations ne sont pas encore bien caractérisés à une gamme de temps après irradiation (Rothkamm and Horn, 2009;Roch-Lefèvre et al., 2012).

En effet, de grands différences inter-individuelles des niveaux de base de γ H2AX et de la cinétique de l'induction et de sa décroissance post-irradiation ont été observés en utilisant des méthodes de quantification des foyers de γ H2AX (manuelle et automatique) (Roch-Lefevre et al., 2010) ainsi que des méthodes de quantification de fluorescence globale (Hamasaki et al., 2007;Ismail et al., 2007;Andrievski and Wilkins, 2009;Roch-Lefèvre et al., 2012). Les niveaux de base de γ H2AX peuvent varier selon une variété des facteurs physiques, chimiques, et biologiques (Takahashi and Ohnishi, 2005) ainsi que des facteurs de style de vie (Roch-Lefevre et al., 2010). Il a été montré par quantification manuel des foyers de γ H2AX qu'il peut y avoir un facteur d'15 des différences inter-individuelles (Roch-Lefevre et al., 2010). Nous avons aussi observé cette grande variabilité des niveaux de base de γ H2AX par quantification manuel de foyers (montré dans la Figure A-1 dans l'annexe) et par la quantification de la fluorescence globale (illustré dans la Figure 4 dans **notre article récent** (Viau, Testard, Shim et al., 2015 sous presse)). L'induction et la décroissance des γ H2AX après irradiation peuvent être associé aux facteurs inhérents génétiques (par exemple, la capacité de réparation d'ADN), qui peut être aussi liés à la radiosensibilité individuelle; en effet, les réponses aigus biologique et la cinétique réduit de la réparation des cassures double-brin sont vus chez les personnes ayant des maladies génétiques bien connus qui influent directement sur la machinerie cellulaire de réparation de l'ADN (telles que des mutations dans ATM, NBS1, MRE11, FANC, BLM, ou LIG1) (Nussenzweig and Nussenzweig, 2007;Joubert et al., 2008). Une variabilité individuelle élevée conduit à une

sensibilité diminuée de la méthode γ H2AX. Par conséquent, la caractérisation de ces différences inter-individuelles à quelques points de temps après irradiation est cruciale pour établir des courbes de dose-réponse qui peuvent être appliquées à la population générale.

Dans cette étude présentée dans **notre article récent** (Viau, Testard, Shim et al., 2015, sous presse), nous avons évalué l'utilité de la quantification globale de γ H2AX comme une méthode de biodosimétrie rapide dans une situation d'urgence. Nous avons ainsi cherché à mieux établir la corrélation entre l'intensité globale de fluorescence de γ H2AX (en utilisant la cytométrie en flux et la microscopie à immunofluorescence à faible grossissement) et la méthode standard de comptage manuel des foyers γ H2AX (en utilisant la microscopie à immunofluorescence à fort grossissement) après une exposition à des rayons γ ou X (200 kV) pour des doses allant de 0,25 Gy à 6 Gy. Pour évaluer l'impact des variabilités inter-individuelles dans la cinétique d'induction radio-induite de l'intensité globale de fluorescence de γ H2AX et de sa décroissance sur les courbes dose-réponse 4 heures post-irradiation, nous avons étudié des fibroblastes humains de 19 donneurs et des lymphocytes de 11 donneurs de radiosensibilité variable. Nous avons caractérisé l'impact de la radiosensibilité individuelle dans le développement d'un outil efficace et rapide de dosimétrie qui peut aider au tri des personnes irradiées lors de situations d'urgence. Nous avons démontré que la quantification de l'intensité globale de fluorescence de γ H2AX en utilisant la cytométrie en flux dans des fibroblastes humains et des lymphocytes 4 heures après irradiation peut permettre le tri des personnes irradiées basé sur les niveaux d'exposition propres sans que leur radiosensibilité individuelle vienne modifier la catégorisation. Nous définissons trois catégories de tri qui pourraient faciliter des soins immédiats et suivis dans le cas d'un accident radiologique (Figure S-1). Ces catégories de tri étaient fondées sur les doses minimales de 2 Gy et 3 Gy précédemment rapporté (IAEA, 2002;Rea et al., 2010) qui conduisent respectivement à des symptômes modérée (soins variable) et sévères (soins d'urgence). Ainsi lorsque le moment de l'irradiation est bien déterminé et que l'analyse peut être effectuée à un délai post-irradiation de 4 heures, la technique de quantification de l'intensité globale de fluorescence de γ H2AX peut être un outil de choix pour l'estimation de la dose permettant un premier tri. Il serait intéressant de développer une commercialisation d'un kit de dosage de γ H2AX, rendant cette approche encore plus attractive.

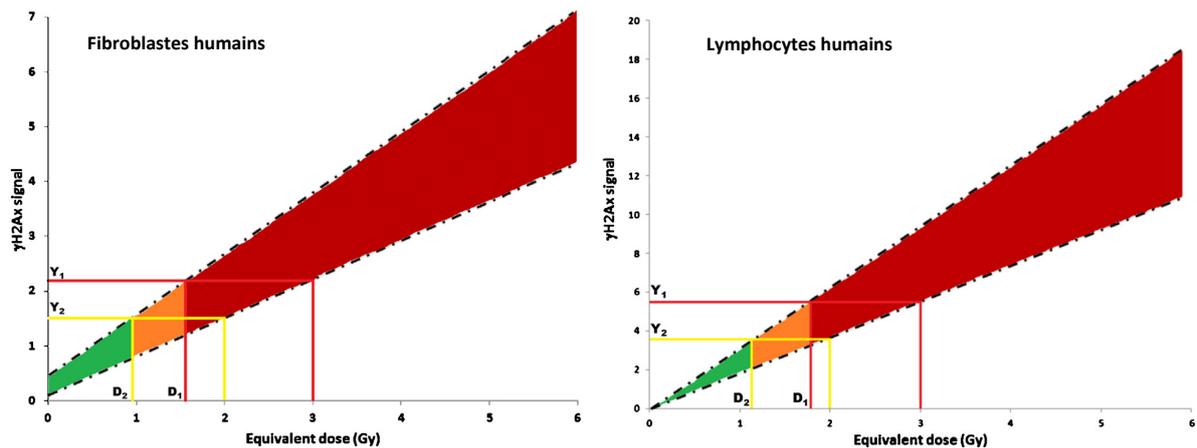


Figure S-1 (Figures 3C et 5C dans notre article (Viau, Testard, Shim et al., 2015, sous presse)). Les 3 catégories proposé de tri en utilisant la quantification de l'intensité globale de fluorescence de γ H2AX par cytométrie en flux dans des fibroblastes humains et des lymphocytes 4 heures après irradiation: la population asymptotique ou non-affecté nécessitant un minimum de soins (sections verte), la population présentant des symptômes modérés qui ne nécessitent pas de soins médicaux immédiats (sections jaune), et de la population qui doit être hospitalisé (sections rouge).

3 - RADIOSENSIBILITE INDIVIDUELLE ET REACTIONS DES TISSUS NORMAUX CHEZ LES INDIVIDUS SAINS

3.1 Radiosensibilité individuelle aux rayons γ

Une approche biologique permettant d'établir de façon fiable le niveau de radiosensibilité reste à développer. L'étude et la quantification de la variabilité inter-individuelle dans la radiosensibilité dépendront directement sur la quantification de biomarqueurs d'exposition aux rayonnements ionisants. Ces quantifications sont aussi confondues par les facteurs nombreux qui influencent la mesure de biomarqueurs (y compris dose, transfert d'énergie linéaire [TEL], et le temps après l'exposition, comme résumé dans la Figure 15). En raison de ces facteurs confondus, il a été difficile de caractériser et de quantifier la radiosensibilité individuelle.

Dans cette étude, nous avons caractérisé les variabilités de réactions des tissus normaux après exposition à une dose de 2 Gy de rayons γ correspondant à une fraction de radiothérapie conventionnelle (Denekamp et al., 1997;Hartel et al., 2010). Nous avons utilisé une version améliorée de la technique de biodosimétrie de référence par quantification des chromosomes dicentriques, avec l'introduction d'un marquage par hybridation *in situ* des télomères et centromères (TC-FISH). La radiosensibilité a été mesurée en termes du nombre moyen de cassures double-brin radio-induites par cellule, calculé après marquage

TC-FISH comme décrit dans la Figure 16, dans des lymphocytes du sang périphérique isolés à partir des sangs prélevés sur 18 individus sains. Les cellules subissant une première mitose à 60 heures après irradiation ont été analysées. Les résultats de cette étude ont mis en évidence différents points :

- La radiosensibilité des individus après une exposition à 2 Gy de rayons γ est montrée dans Figure 17A (dans l'ordre croissant de sensibilité à l'irradiation). Les individus ont été désignés comme Donneurs A à R du plus « radiorésistant » au plus « radiosensible ». Ce classement a été utilisé dans toute la thèse de manière à définir la radiosensibilité de chacun des donneurs. Les donneurs plus radiosensibles montrent plus cassures double-brin par cellule, avec une large gamme de distribution des cassures double-brin par cellule, par rapport aux donneurs plus radiorésistants (Figure 17B). Il est intéressant de souligner que nous avons trouvé une gamme similaire de cassures double-brin radio-induites mesurée en utilisant TC-FISH entre cette cohorte (Figure 17A), qui comprend des personnes sélectionnées à partir d'une plus grande cohorte de 63 personnes le long de la gamme de radiosensibilité mesuré précédemment sur la base de l'induction de l'apoptose radio-induite (Schmitz et al., 2003), et la cohorte dans (M'Kacher et al., 2014), qui comprenait un groupe complètement aléatoire des individus en bonne santé, échantillons de sang obtenu au centre médical au CEA Fontenay-aux-Roses, France (Figure 18). Bien que ces analyses doivent être étendues à de plus grandes cohortes, la similitude dans la gamme de ces mesures TC-FISH entre la cohorte sélectionnée au hasard (Figure 18) et non aléatoire sélectionné (Figure 17A) suggère que ces mesures pourraient représenter la gamme de la radiosensibilité d'une partie importante de la population.
- Nous avons également examiné la radiosensibilité à d'autres doses de rayons γ et avons généré des courbes dose-réponse (Figure 19 et Figure 20). Ces courbes à des doses 0 à 5 Gy ne montrent pas de différences significatives entre les 3 groupes de différente radiosensibilité. Cependant, à des doses faibles (<1 Gy ; Figure 19C et D), les donneurs plus radiosensibles montrent une tendance qui est différente parmi les groupes modérément radiosensibles et radiorésistants ; cette tendance est plus distincte à la dose de ~0,5 Gy. Bien que cette tendance doit être vérifiée dans une cohorte plus grande, ce résultat peut démontrer la différente réponse biologique à de faibles doses d'exposition aux rayonnements ionisants chez les individus qui sont très radiosensibles. Ces résultats peuvent mettre en évidence l'importance de l'identification de ces personnes très radiosensibles et l'adaptation des protocoles de radiologie diagnostique et de radioprotection basés sur la radiosensibilité individuelle afin de mieux protéger ces personnes.

- Enfin, à partir des conclusions d'une étude récente de notre laboratoire (M'Kacher et al., 2014), nous avons évalué la sensibilité des lymphocytes cultivés de différentes façons (Figure 20). L'analyse de TC-FISH avec les lymphocytes isolé du sang périphérique offre une estimation plus précise de la dose qu'en utilisant les mêmes analyses sur sang total. Cette approche améliorée peut avoir des implications importantes dans l'évaluation du risque génotoxique et de dosimétrie biologique, en particulier à de faibles doses. Si la technique automatisée que nous avons développée dans notre laboratoire (DCScore) peut confirmer ces résultats sont encore à déterminer.

3.2 Comparaison de la radiosensibilité individuelle après exposition aux rayons γ et aux ions carbone

Les schémas actuels de radiothérapie utilisent soit des photons (des X ou des rayons γ) soit des protons pour le traitement d'une grande variété de tumeurs malignes. Cependant, comme des rayonnements ionisants de TEL élevé possèdent des avantages radiobiologique par rapport aux rayonnements de faible TEL, en raison de leurs caractéristiques inhérentes qui sont utiles notamment pour le traitement des tumeurs profondes dans le corps humain, le traitement par radiothérapie du cancer est en train de passer à l'utilisation d'espèces d'ions lourds (Schlaff et al., 2014). Parmi les différents types d'espèces d'ions lourds considérés pour la radiothérapie, les ions de carbone présenteraient des propriétés plus équilibrées et optimales, en termes de distribution de dose physique et d'efficacité biologique relative (EBR) sur sa courbe de Bragg (Kamada et al., 2015). Cependant, avec seulement quelques centres à travers le monde (6 en Asie et 2 en Europe) la radiothérapie par ions carbone n'est pas encore largement utilisé (Jermann, 2014). Bien que des données cliniques préliminaires des centres utilisant les ions carbone suggèrent des résultats plus favorable pour le traitement des tumeurs malignes que les traitement par de radiothérapie conventionnelle (Kamada et al., 2015), le manque de suffisamment de preuves cliniques de l'avantage de la thérapie par ions carbone sur la radiothérapie conventionnelle entrave le développement de plus des centres de thérapie et des recherches cliniques (Schlaff et al., 2014). Des études plus approfondies sont nécessaires pour caractériser et comprendre comment la thérapie par ions carbone fonctionne en comparaison à la radiothérapie conventionnelle. De plus, la description précise et la compréhension d'EBR à une gamme de doses est d'un intérêt particulier pour la régime du traitement, car les traitement hypofractionnée sont devenus de plus en plus important dans la thérapie par d'ions lourd (Friedrich et al., 2014). En outre, si les différences inter-individuelles de la radiosensibilité existent après une exposition des rayonnements ionisants

de TEL élevé et si elles jouent un rôle dans la détermination d'EBR des ions lourds reste à établir.

Dans cette étude, nous avons réalisé les mêmes analyses que dans la Section 3.1 mais après exposition aux ions carbone-13 (75 MeV/u ; TEL ~ 36.5 keV/ μm dans la partie plateau de la courbe de Bragg) à une dose de 2 Gy sur les lymphocytes du sang périphérique sur 13 des 18 donneurs précédents (Section 3.1), et nous les avons comparé aux résultats après exposition aux rayons γ . Les résultats clés de cette étude sont comme suit :

- Nous avons démontré que l'ordre de radiosensibilité des donneurs après irradiation aux ions carbone est différent de celui après exposition aux rayons γ (Figure 21A et Figure 22B). De plus, l'irradiation carbone provoque, par cellule, une plus grande gamme de cassures double-brin et plus de dommages radio-induits qui sont moins bien réparés qu'avec les rayons γ . Après exposition des lymphocytes du sang périphérique à ces 2 types d'irradiations, nous avons mis en évidence une absence de corrélation au niveau de leur radiosensibilité, mettant ainsi en évidence qu'un même donneur présente une radiosensibilité différente selon les rayonnements ionisant utilisés (Figure 22A).
- Nous avons déterminé une EBR de 3 pour les ions carbones par rapport à une irradiation γ à 2 Gy (Figure 24). Nous avons calculé cette valeur de EBR en divisant les cassures double-brin moyennes par cellule déterminée en utilisant TC-FISH suite d'une exposition à des ions carbone par ceci suivante la même dose de rayons γ . Nous avons confirmé cette EBR par une deuxième technique de cytogénétique, « multicolor » (M)-FISH (Figure 23). Par conséquent, la détermination du facteur EBR carbone, par rapport à des rayons γ , est indépendante de la méthode de quantification des dommages chromosomiques utilisés. TC-FISH et M-FISH peuvent donc être considérés comme deux approches alternatives pour le comptage des dommages chromosomique. Basé sur ces résultats, nous avons donc préféré la technique TC-FISH. En effet, celle-ci est à la fois moins couteuse et plus rapide en terme de technique et d'analyse que le M-FISH.
- Enfin, l'EBR des ions carbone par rapport aux rayons γ est plus élevé pour des doses inférieures à 0.5 Gy alors qu'il tend vers 1 aux doses élevées, comme montré dans la Figure 24C. Ces résultats d'EBR dose-dépendant confirment les résultats déjà publiés (Friedrich et al., 2014), et illustrent l'importance des différents effets biologiques à faibles doses.

3.3 Radiosensibilité individuelle après exposition aux protons et effet de l'énergie des rayonnements ionisant sur la radiosensibilité

Malgré la plus grande expérience dans l'utilisation thérapeutique de protons par rapport aux ions plus lourds, les différences d'EBR des protons par rapport aux photons et des réponses biologiques cellulaire et tissulaire ne sont pas encore bien établies. Actuellement, protons de haute énergie sont considérés comme des photons, et un EBR fixe de 1,1 par rapport à photons thérapeutiques est utilisé dans le traitement de photons pour l'ensemble du champ de rayonnement. Bien que certaines études soutiennent l'idée que cette EBR fixe est une approximation raisonnable, il reste à discuter si l'utilisation d'un EBR fixé pour les protons est toujours appropriée, ou si la connaissance actuelle justifie un change vers une EBR variable, en tenant compte de la dépendance sur TEL, les propriétés du tissu, de la dose, et le fractionnement de la dose (Tommasino and Durante, 2015).

Dans cette étude, nous avons évalué l'EBR des protons à différentes positions autour du pic de Bragg optimisé pour la radiothérapie (« spread out Bragg peak », SOBP). Les échantillons ont été exposés à 2 Gy de protons de deux énergies différentes (73 MeV et 200 MeV) à 3 positions différentes: à l'entrée (Position A), au milieu (Position B), et en sortie (Position C). Les lymphocytes du sang périphérique de 2 donneurs sains à radiosensibilité modérée aux rayons γ (Donneurs H et K) ont été analysés par TC-FISH (Figure 25). Nous avons ensuite comparé l'effet de l'énergie des rayonnements ionisants sur la radiosensibilité en comparant ces résultats avec ceux des rayons γ et des ions carbone (Figure 26). Nos données du EBR pour les deux faisceaux d'énergie de protons rejoignent les études antérieures qui mettent en évidence le fait que les protons de haute énergie peuvent être considérées comme des photons en termes de l'efficacité biologique (Tommasino and Durante, 2015).

4 - ROLE DES LONGUEURS DES TELOMERES ET DE LEUR MAINTIEN SUR LA RADIOSENSIBILITE INDIVIDUELLE

4.1 Variations individuelles intrinsèques de la longueur des télomères et de l'instabilité télomérique

Dans cette étude, nous avons caractérisé les différences intrinsèques des longueurs des télomères et de leurs niveaux de base de dysfonctionnement (mesurée en fonction des niveaux des anomalies télomériques comme par exemple, la perte de télomères ou les doublets) dans des lymphocytes du sang périphérique d'individus sains. Pour chaque cellule en métaphase, les longueurs des télomères ont été mesurées via l'intensité totale de

fluorescence de télomères après coloration par TC-FISH, et ont été normalisées par le nombre de chromosomes de la métaphase analysée. Les anomalies des télomères (perte et doublets) ont été visualisées comme illustré sur la Figure 28A. Les longueurs moyennes intrinsèques des télomères chez les individus sains diminuent avec l'âge (Figure 27), et il existe de grandes variabilités dans les niveaux de base de dysfonctionnement des télomères qui n'est pas corrélé avec l'âge (Figure 29). Nous émettons l'hypothèse que la longueur intrinsèques des télomères est fortement influencée par l'âge (Figure 27), et les niveaux de base de l'instabilité des télomères sont liées à des facteurs confondant tels que style de vie (Lin et al., 2012; Price et al., 2013).

4.2 La longueur des télomères comme un prédicteur de la radiosensibilité à l'irradiation γ à court terme

Dans cette étude, nous avons évalué si la radiosensibilité individuelle après exposition à une dose thérapeutique de 2 Gy de rayons γ (noté RS2g; résultats précédemment décrits dans Section 3.1.1 et présentés dans la Figure 17A) peut être prédite par un seul ou une combinaison de variables, tels que l'âge, le sexe, et la longueur moyenne intrinsèque des télomères et de leurs changements radio-induits. Pour cette discussion, nous avons considéré la « radiosensibilité » uniquement en termes du nombre moyen de cassures double-brin radio-induites (visible au niveau des anomalies chromosomique) par cellule, comme décrit dans Section 3.1.1. Globalement, l'âge et le sexe sont des prédicteurs significatifs de la radiosensibilité après exposition à 2 Gy de rayons γ (Equation 2, Table 4, Figure 30). La longueur moyenne des télomères après d'irradiation à une dose de 2 Gy de rayons γ diminue en général avec l'âge dans cette cohorte (Figure 31A). Aussi, les *variations* de la longueur moyenne des télomères après exposition à une dose de 2 Gy de rayons γ ne semblent pas être corrélées avec l'âge, mais de façon générale, les longueurs moyennes des télomères ont diminué après exposition γ (Figure 31B). Comme cela est montré dans la Table 5, nous constatons que la longueur moyenne intrinsèque des télomères (TL0) seuls ou les variations radio-induite de la longueur moyenne des télomères (Δ TLg) seuls ne prédisent pas RS2g. Cependant, la combinaison de TL0 et Δ TLg peut être un bon prédicteur de la radiosensibilité individuelle (Table 5, Colonne (3)). De plus, TL2g seul peut aussi être un bon prédicteur de RS2g (Table 5 et Figure 32). Il est intéressant de noter que bien qu'aucune corrélation n'existe entre RS2g et Δ TLg, nous avons trouvé de légères corrélations entre RS2g et les variations de la longueur moyenne des télomères dans les cellules dont les télomères étaient initialement *plus courts* (Figure 33). Ces

résultats très préliminaires nécessitent une validation avec des mesures plus standardisées (kb) et une sélection de donneurs présentant des télomères « extrêmes ».

5 - RÔLE DE TÉLOMÈRES DANS DES RISQUES POUR LA SANTÉ HUMAINE À LONG TERME APRÈS IRRADIATION

5.1 *La longueur des télomères comme un prédicteur de maladies cardiovasculaires*

Lymphome de Hodgkin est une maladie hématologique maligne qui touche principalement les jeunes patients. Malgré le taux très élevé de guérison de ce type de cancer en utilisant radiothérapie et la chimiothérapie (Specht et al., 2014), il est associé à de faibles taux de survie à long terme en raison des complications secondaires non liés au cancer (tels que les maladies cardiovasculaires), ainsi que des cancers secondaires, longtemps après avoir été guéris de leur maladie initiale (Castellino et al., 2011). L'exposition aux rayonnements ionisants a récemment été corrélée avec un excès de risque cardiovasculaire et cérébrovasculaire. De plus, le raccourcissement des télomères a été lié à la morbidité et la mortalité cardiovasculaire. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour clarifier le lien entre le raccourcissement radio-induit des télomères et le développement / progression des effets vasculaire et plus spécifiquement cardiovasculaires (Sabatino et al., 2012).

Dans cette étude présentée dans **notre article récent** (M'Kacher et al., 2015), nous avons évalué la longueur des télomères dans les lymphocytes du sang périphérique de 179 patients atteints de lymphome de Hodgkin qui ont été traités par radiothérapie et guéris de leur cancer (traités à l'âge médian de 29 ans). Nous avons étudié si la longueur des télomères pouvait être corrélée avec le développement de maladies cardiovasculaires dans ce sous-ensemble de patients. Les autres facteurs pronostiques classiques étudiés sont décrits en détail dans (Girinsky et al., 2014). Nous avons montré que le raccourcissement des télomères (Figure S-2) pourrait être un nouveau facteur pronostique des maladies cardiovasculaires après radiothérapie. Cette étude est la première à démontrer le rôle majeur des télomères dans la survenue de maladies cardiovasculaires dans une population exposée aux rayonnements ionisants pour des raisons médicales. Cette étude met donc en évidence que la quantification des télomères est un facteur pronostique intéressant pour ce qui est du risque cardiovasculaire de la population exposée au rayonnement ionisant. Cela nécessiterait la mise en œuvre du développement d'une méthode clinique afin de mesurer la longueur des télomères.

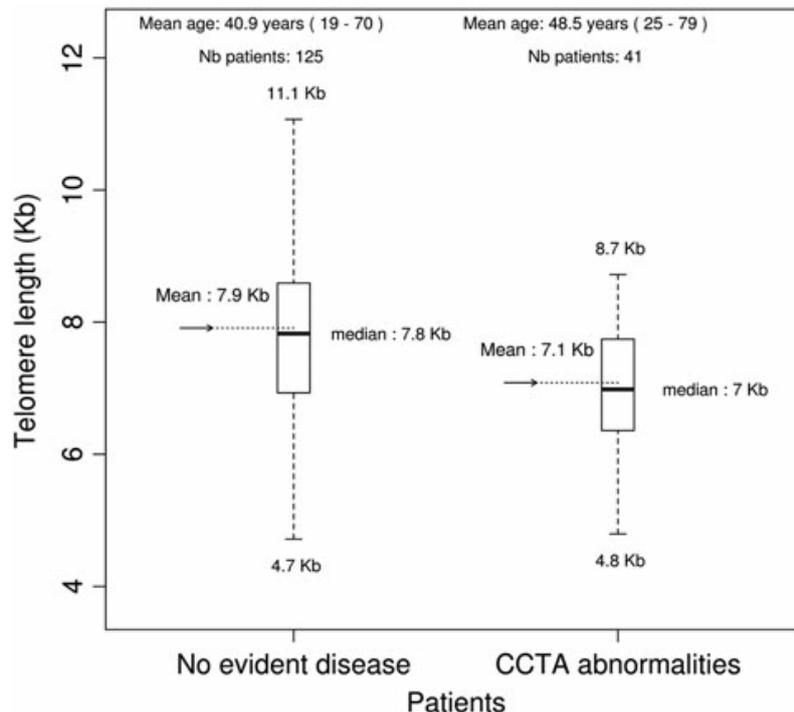


Figure S-2 (Figure 1 dans notre article (M'Kacher et al., 2015)). Les comparaisons des longueurs de télomères des lymphocytes du sang périphérique de patients atteints de lymphome Hodgkin atteints de maladies cardiovasculaires (par angiographie coronaire par tomographie par ordinateur anormale) par rapport aux patients sans maladie cardiovasculaire évidente. Les patients atteints de maladies cardiovasculaires ont raccourcissement significatif des télomères et moins d'hétérogénéité dans la longueur des télomères.

5.2 Les télomères comme acteurs clés dans le processus de la cancérogenèse radio-induite

Dans **notre récent article** (Shim et al., 2014), nous avons discuté des connaissances actuelles sur les télomères, des mécanismes de maintien des télomères, et les mécanismes de dommages et de réparation des télomères. Nous avons compilé toutes les études importantes publiées dans la littérature sur les protéines shelterin et des protéines de la réponse des dommages à l'ADN ainsi que les conséquences de leur déficience ou des dysfonctionnements sur la longueur de télomères et de la fusion de ceux-ci chez les êtres humains et les souris. Sur l'analyse d'une pléthore de données contradictoires dans la littérature, ces nouveaux tableaux (Tables 1 et 2 dans l'article) mettent en évidence la complexité de l'étude de ces mécanismes *in vitro* et *in vivo*. Nous avons discuté de ce qui est actuellement connu sur les lésions télomériques et chromosomiques induites par l'exposition directe et/ou indirecte aux rayonnements ionisants, et les mécanismes par lesquels ces dommages radio-induits peuvent conduire à une instabilité génétique pendant la prolifération cellulaire.

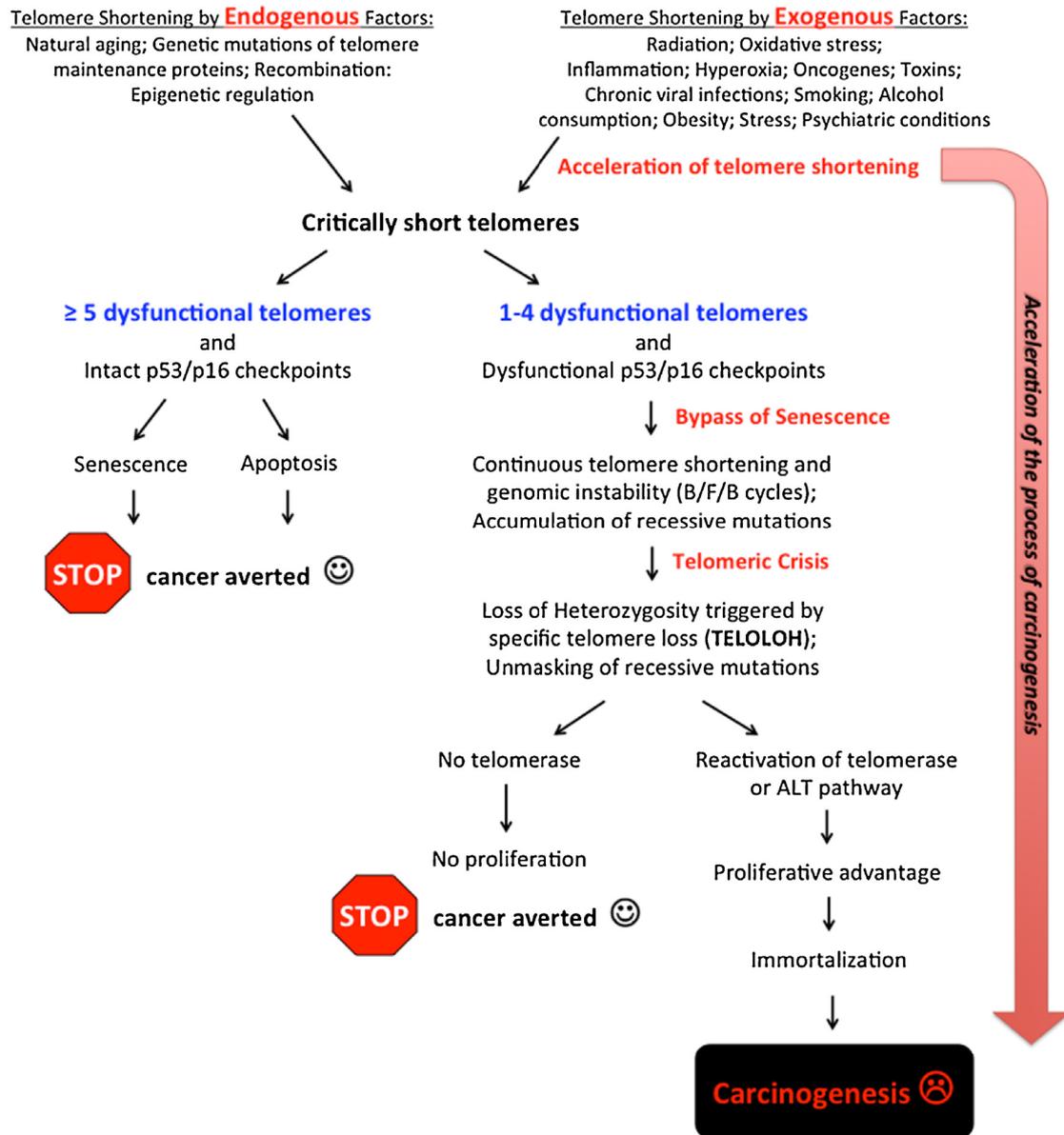


Figure S-3 (Figure 3 dan notre article (Shim et al., 2014)). Notre modèle proposé sur l'impact de la hétérogénéité de la longueur des télomères sur les processus de vieillissement cellulaire, la sénescence, la crise, et la carcinogène.

Enfin, dans la conclusion de l'article, nous proposons un modèle détaillé de la façon dont les télomères peuvent être un acteur clé dans le processus de carcinogène radio-induite. En résumé, les télomères et la dysfonction radio-induite des mécanismes de leur maintenance jouent un rôle central dans l'émergence retardée de l'instabilité génétique et dans l'accélération du vieillissement après irradiation (Figure 1 dans l'article). Comme l'instabilité génomique peut être induite par la dérégulation du maintien des télomères (télomères trop courts ou dérèglement des protéines shelterin, et des protéines de la réponse des dommages à l'ADN, facteurs qui ont tous été liés à la progression du cancer),

ces derniers peuvent être considérés comme facilitant le processus de cancérogenèse radio-induite (Figures 2 et 3 dans l'article, ce dernier montré dans la Figure S-3 ci-dessus). Ces facteurs peuvent avoir des répercussions importantes sur les risques pour la santé à long terme, et peuvent être corrélées directement à l'efficacité et les conséquences à long terme du traitement du cancer par radiothérapie.

6 - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

6.1 Les télomères comme acteurs clés dans le processus de cancérogenèse radio-induite et maladies cardiovasculaires, et l'influence de la radiosensibilité individuelle

Ici, nous reconsidérons le modèle détaillé présenté à la fin de **notre article** (Shim et al., 2014) (présenté dans Section 6). Nous mettons à jour notre modèle précédemment publié pour la carcinogenèse avec des résultats publiés récemment, et en utilisant les résultats présentés dans cette thèse, nous intégrons le rôle clé joué par les télomères dans le développement des maladies cardiovasculaires et comment la radiosensibilité individuelle peut influencer ces processus. ***Dans notre modèle (Figure 34), nous proposons que l'hétérogénéité de la longueur des télomères, le raccourcissement continu des télomères, et le déclenchement des voies de réparation de dommages à l'ADN et la sénescence en raison du dysfonctionnement télomérique jouent un rôle essentiel dans le processus de cancérogenèse et/ou dans le développement des maladies cardiovasculaires.***

Comme illustré dans la Figure 34, la longueur des télomères (qui varie selon les individus (Gilson and Londono-Vallejo, 2007;Hernandez et al., 2015;Lapham et al., 2015), selon les différents types cellulaires chez un seul individu, mais aussi sur les bras des chromosomes dans une seule cellule donnée (Pommier and Sabatier, 2002)) diminue de façon continue naturellement à chaque cycle de réplication cellulaire (Harley et al., 1990). Ce raccourcissement des télomères peut être accéléré soit par une exposition aux rayonnements ionisants soit par une augmentation de la prolifération cellulaire dans le but de remplacer des cellules mortes après exposition, ou encore par les dommages télomériques radio-induits (irradiation directe ou stress oxydatif) empêchant ainsi maintien des télomères. Le raccourcissement accéléré des télomères sera prolongé par une exposition continue à d'autres agents endogènes et exogènes endommageant l'ADN au cours de la vie de la cellule (d'Adda di Fagagna et al., 2003;Jackson and Bartek, 2009;Lin et al., 2012;Price et al., 2013). Considérant que l'hétérogénéité de la longueur des télomères

sur chaque bras des chromosomes individuels est maintenue lors du raccourcissement télomérique à chaque cycle cellulaire, les télomères les plus courts finiront par devenir critiques et dysfonctionnels. Dans les cellules normales avec des points de contrôle intacts du cycle cellulaire, ces télomères dysfonctionnels ou non-protégés sont détectés comme des dommages de l'ADN ; les mécanismes de réponse aux dommages de l'ADN sont activés formant ainsi des TIF (foyers induits par les télomères dysfonctionnels) (Takai et al., 2003). Une étude importante a suggéré que les cellules humaines normales sont capables de tolérer un petit nombre de télomères dysfonctionnels et continuent à proliférer jusqu'à ce qu'un seuil de cinq TIF par cellule soit atteint. Dans les cellules normales avec des points de contrôle intacts du cycle cellulaire, la sénescence ou l'apoptose sont déclenchées lorsque ce seuil de cinq télomères dysfonctionnels est atteint. Dans les cellules immortalisées, qui sont incapables de sénescence à cause de la perte de protéines de points de contrôle du cycle cellulaire (tels que p53 ou p16), la sénescence est temporairement contournée, et les cellules continuent à proliférer tout en accumulant des instabilités chromosomiques, des TIF, et des raccourcissements télomériques, jusqu'à ce qu'une « crise télomérique » soit atteinte. Dans les cellules subissant cette crise, plus de cinq télomères dysfonctionnels ont été trouvés (Kaul et al., 2012), avec fusion massive de chromosomes et mort cellulaire (Counter et al., 1992; Counter et al., 1994; Ducray et al., 1999), sûrement dû à un raccourcissement extrême des télomères et de la perte des protéines shelterin. ***Nous proposons que cette mort cellulaire en raison de « trop » d'instabilité génomique arrête le processus de cancérogenèse, mais soit responsable de l'augmentation du risque de maladies liées à la mort cellulaire, comme les maladies cardiovasculaires si cette mort cellulaire se produit dans les tissus vasculaires*** (Figure 34). Il a été proposé que les grandes variations observées d'une part dans l'apparition de maladies cardiovasculaires et d'autre part dans l'âge de manifestation (y compris chez des individus présentant des facteurs de risque similaires) soit dû à des différences au niveau du taux de vieillissement biologique. Le vieillissement est un facteur de risque majeur de l'athérosclérose, qui est une cause sous-jacente commune des maladies cardiovasculaires. Le dysfonctionnement endothélial lié au vieillissement a été proposé pour être le lien entre ces variables. Le dysfonctionnement endothélial peut survenir en raison de bombardement continu des cellules endothéliales par des stimuli athérogènes (par exemple, le taux de cholestérol plasmatique élevé, l'hypertension, le diabète, le tabagisme). Le dysfonctionnement endothélial a été montré pour être d'une importance capitale dans le développement et la progression de l'athérosclérose. Des dommages mécaniques, hémodynamiques, et/ou immunologiques continus (y compris probablement le stress oxydatif) à des cellules endothéliales vasculaires au cours de la progression de l'athérosclérose peut provoquer une augmentation du

renouvellement cellulaire localisée, conduisant à la sénescence cellulaire, la mort cellulaire myocardique, ou de la fibrose. Il a été montré que le raccourcissement des télomères qui se produit dans le tissu vasculaire humain, peut être lié aux maladies vasculaires associées à l'âge. Les télomères ont également été liée à plusieurs facteurs qui influent sur le risque cardiovasculaire (par exemple, l'hypertension, le diabète, les estrogènes, le stress oxydatif, le stress psychologique), la néovascularisation, l'athérosclérose, et les maladies du cœur. En outre, l'instabilité génomique peut jouer un rôle crucial dans l'apparition de l'athérosclérose (Balasubramanyam et al., 2007; Lin et al., 2012; Sabatino et al., 2012; Andreassi et al., 2015).

D'autre part, comme montré dans la Figure 34, ***dans le cas de la cancérogenèse, nous proposons que l'accumulation « prudente » de l'instabilité génomique quand il y a 1 à 4 télomères dysfonctionnels en présence de points de contrôle dysfonctionnels du cycle cellulaire et/ou des mécanismes de réponse aux dommages de l'ADN est la clé du destin de la cellule/être.*** En effet, l'instabilité génomique est un facteur important qui favorise l'acquisition des traits caractéristiques du cancer (Hanahan and Weinberg, 2011), mais « trop » d'instabilité génomique serait préjudiciable et conduirait à la mort cellulaire ou la sénescence, tandis que « pas assez » d'instabilité génomique ralentirait la progression de la tumorigenèse. Aussi, « le juste milieu » d'instabilité génomique permettrait de réduire le taux de mort cellulaire/sénescence tout en maximisant le taux de progression vers la carcinogenèse (Komarova and Wodarz, 2004). Nous avons discuté dans cette thèse que l'instabilité génomique peut être induite par la dérégulation du maintien des télomères, des protéines shelterin, et des protéines de la réponse des dommages de l'ADN (Section 1.1). Nous avons également examiné comment le dysfonctionnement de ces facteurs peut être induit après une exposition directe ou indirecte (via l'effet de proximité « bystander ») aux rayonnements ionisants. En outre, comme discuté dans Section 1.2, l'exposition aux rayonnements ionisants induit également une variété d'autres dommages à l'ADN et cellulaires, plus particulièrement les cassures double-brin et le dysfonctionnement mitochondrial. Les cassures double-brin de l'ADN peuvent entraîner la formation d'aberrations chromosomiques. Des signaux de stress pouvant être transmis aux descendants des cellules irradiées, mais aussi aux cellules bystander non-irradiées et leur descendants, conduisant à de stress oxydatif continu, des lésion cellulaire prolongé, et des propagation de l'instabilité génomique ; les télomères eux-mêmes peuvent jouer un rôle dans la transmission à long terme de l'instabilité chromosomique (Shim et al., 2014). Comme présenté dans cette thèse, il existe des variations inter-individuelles de radiosensibilité, mesurées en termes de cassures double-brin radio-induites (Section 3), qui peuvent être liées à l'âge, le sexe, et les longueurs intrinsèques des télomères et leurs

modifications radio-induites (Section 4). De plus, le dysfonctionnement mitochondrial radio-induit produit par un excès d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) peut causer de plus amples dommages au génome. Ce dysfonctionnement mitochondrial peut également se propager dans des cellules bystander et leurs descendants, ce qui conduit à un stress oxydatif prolongé produisant plus des lésions à l'ADN longtemps après exposition. Le stress oxydatif prolongé peut donc exacerber l'instabilité génomique (Azzam et al., 2012; Shim et al., 2014; Morgan and Sowa, 2015). **Tous ces facteurs peuvent aussi être liés aux télomères, comme leurs dysfonctionnements (naturel et/ou radio-induite) peuvent provoquer et propager l'instabilité génétique et la perte d'hétérozygotie (discuté ci-dessous). Ainsi, les télomères peuvent être considérés comme des acteurs clés dans le processus de cancérogenèse radio-induite.** Donc, sur la voie de la carcinogenèse, à ces faibles niveaux de dysfonctionnement des télomères (1 à 4 télomères dysfonctionnels), des faibles niveaux d'instabilité chromosomique peuvent être autorisés à persister, y compris l'accumulation de mutations récessives dans le génome à chaque génération successive. Dans le cas où les mutations récessives sont démasquées par la perte d'hétérozygotie (LOH), cela permettrait l'émergence de cellules avec un avantage prolifératif. Avec le raccourcissement continu des télomères à chaque cycle cellulaire, la crise télomérique peut conduire à la perte de chromosomes entiers ou des parties de bras chromosomiques, démasquant ainsi en une seule étape les mutations récessives de centaines de gènes qui se sont accumulés dans le génome; ces mutations récessives seraient sinon restées silencieuses sauf si l'autre allèle normal avait été muté, événement hautement improbable. Ce phénomène que nous avons nommé "TELOLOH" est déclenché par le télomère le plus court atteignant en premier le seuil d'instabilité (Pommier et al., 1995). Cela pourrait conduire à l'émergence de cellules avec un avantage prolifératif, surtout lorsqu'il est couplée avec une perte de la fonction de suppresseur de tumeur et l'activation de la télomérase et/ou des voies d'ALT (allongement alternatif des télomères), conduisant ainsi à l'immortalisation de la cellule et éventuellement la carcinogenèse (Pommier et al., 1995; Sabatier et al., 1995; Raynaud et al., 2008).

Comme la vitesse de ces processus varie en fonction de l'hétérogénéité intrinsèque de la longueur des télomères de l'individu, ce facteur peut être considéré comme la pierre angulaire de la prédisposition individuelle à la cancérogenèse ou à des maladies cardiovasculaires. L'accélération du raccourcissement des télomères peut conduire à une accélération de l'ensemble de ce processus de carcinogenèse et/ou le développement de maladies cardiovasculaires. En outre, l'accumulation de dommages génomiques radio-induits peut être d'un intérêt particulier chez les personnes très radiosensibles. En effet, ces individus subissent plus de dommages radio-induits dans le génome (comme montré dans

cette thèse) qui peuvent ne pas être correctement réparés par rapport aux individus plus radiorésistants. Inversement, les personnes radiosensibles, le sont, à cause des mutations génétiques intrinsèques (par exemple défauts/déficiences dans les gènes impliqués dans les voies de réparation des dommages de l'ADN ou des protéines impliquées dans l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire ou de la réplication/réparation de l'ADN), ce qui peut également les prédisposer aux cancers ou aux maladies cardiovasculaires associés aux expositions aux rayonnements ionisants. Ces considérations soulignent l'importance de l'identification des personnes très radiosensibles. L'adaptation des protocoles de diagnostics radiologiques et de radioprotection basés sur la radiosensibilité individuelle est importante afin de mieux protéger ces individus radiosensibles, ce qui n'est pas le cas en vertu des recommandations actuelles qui utilisent des moyennes de radiosensibilité dans la population (Advisory Group on Ionising Radiation, 2013).

6.2 Les télomères et leur maintien comme prédicteur de la radiosensibilité individuelle

Plusieurs caractéristiques des télomères et des mécanismes de leur maintenance font des télomères un candidat prometteur comme biomarqueur prédictif (discuté en détail dans **notre article** (Shim et al., 2014) présenté dans la Section 6). En accord avec notre article (Shim et al., 2014), un article récent (Mirjolet et al., 2015) met en évidence le potentiel des télomères et de leur maintien comme acteurs clés dans la prédiction de la radiosensibilité individuelle qui peuvent être appliqués pour personnaliser les protocoles de radiothérapie. Les points clés à l'appui télomères comme biomarqueur prédictif de la radiosensibilité individuelle sont résumés ici :

- La longueur des télomères varie entre individus et chez un même individu, y compris dans une cellule donnée. La longueur des télomères dans les tissus prolifératifs somatiques diminue naturellement au cours de chacun des cycles de réplication cellulaire, et donc avec l'âge. Le raccourcissement naturel des télomères peut être accéléré par des facteurs endogènes (par exemple des stress métabolique conduisant à des mutations ponctuelles ou des délétions dans les gènes codant pour des protéines impliquées dans la protection des télomères, ainsi que la recombinaison et la régulation épigénétique) et par des facteurs externes de stress environnemental et de style de vie qui provoquent les cassures double-brin de l'ADN ou une mauvaise réplication des télomères (par exemple les rayonnements ionisants et d'autres agents oxydants, le stress oxydatif, l'inflammation, l'hyperoxie, les oncogènes, des toxines, des infections

virales chroniques, le tabagisme, la consommation d'alcool, l'obésité, le stress, et les conditions psychiatriques). La longueur des télomères **peut donc être considérée comme un marqueur pronostique prenant en compte un ensemble de tous les événements passés.**

- La longueur réduite des télomères reflète l'accumulation d'insultes précédentes de diverses conditions d'endommager et a été associé à de nombreuses maladies chroniques qui sont généralement considérées comme des maladies du vieillissement, telles que le diabète, le cancer, et les maladies cardiaques (M'Kacher et al., 2015). L'activité anormale de la télomérase et la régulation de la longueur des télomères ont également été associées à la pathologie de plusieurs maladies humaines liées à l'âge, comme décrit dans la Section 1.1.3 (Armanios and Blackburn, 2012; Holohan et al., 2014). La télomérase est régulée à la hausse dans environ 85% des cancers humains (et est silencieuse dans la plupart des cellules différenciées telles que des cellules somatiques normales), suggérant son rôle important dans le processus d'immortalisation cellulaire et de la tumorigenèse. **Cela montre que les télomères et leurs mécanismes de maintien jouent des rôles importants à différents stades de l'initiation et du développement du cancer et d'autres pathologies humaines.**
- Les régions télomériques (et les régions sous-télomérique) sont particulièrement sensibles au stress oxydatif radio-induit et sont plus enclins aux cassures double-brin de l'ADN, peut-être en raison de leur traitement inapproprié : la présence de dommages à l'ADN dans les séquences télomérique entrave la réplication des télomères, conduisant à un raccourcissement ou à la perte de ces derniers. Il a été suggéré que la déficience de réparation des cassures double-brin de l'ADN près des télomères joue un rôle dans l'instabilité chromosomique associé à des cancers humains. **Cela rend les télomères plus sensibles à l'exposition aux rayonnements ionisants que le reste du génome, et donc à la radiothérapie.**
- Il y a une relation bidirectionnelle et co-dépendante entre les télomères et les mécanismes de réparation de dommages à l'ADN. Comme les télomères dysfonctionnels sont reconnus comme cassures double-brin et déclenchent les voies de réparation de dommages à l'ADN, dont les protéines sont également impliquées dans le maintien et la protection des télomères (Section 1.1.2). **Comme les processus de réparation de dommages à l'ADN sont également étroitement liés à la radiosensibilité, le maintien des télomères pourrait aussi probablement être étroitement lié à la radiosensibilité.**

Toutes ces preuves indiquent que les télomères et leur maintien pourraient être des biomarqueurs sensibles et fiables de l'exposition aux rayonnements ionisants, et pourraient être un nouveau paramètre pour prédire la radiosensibilité individuelle (Shim et al., 2014; Mirjolet et al., 2015). Comme nous avons constaté que la radiosensibilité pourrait en effet être prédite par une combinaison de l'âge et du sexe, ainsi que la combinaison de la longueur intrinsèque des télomères et leurs changements radio-induits avec analyse TC-FISH (Section 4.2), nous proposons que ces facteurs puissent être adaptés pour établir une méthode clinique de l'identification des personnes radiosensibles. La capacité de prédire de façon fiable la radiosensibilité individuelle aurait des implications importantes dans la dosimétrie biologique (examinée en détail dans la Section 1.4.3) et radiothérapie (examinée en détail dans la Section 1.4.2). En effet, elle permettrait de raffinement des protocoles de radioprotection pour identifier et protéger tout particulièrement les individus fortement radiosensibles. Bien que l'analyse des télomères et de leur longueur, en utilisant TC-FISH (ou d'autres méthodes) peut être trop complexe (et prendre trop de temps) à utiliser comme biomarqueur pour fournir des estimations de la dose à utiliser en biodosimétrie (en raison de l'intra et l'inter-individuelle hétérogénéité de la longueur des télomères), la connaissance préalable de la radiosensibilité d'un individu (i.e. les personnes qui ont déjà été classées comme très radiosensibles) pourrait aider à un triage médical approprié de ces individus. L'analyse par TC-FISH des télomères et leur longueur pour prédire la radiosensibilité individuelle pourraient, cependant, être utile dans le contexte de la radiothérapie. Néanmoins, il reste la question de savoir comment mesurer et ranger efficacement les individus en fonction de leur radiosensibilité, comme discuté dans la Section 1.4.3. Cependant, la méthode que nous utilisons pour créer des catégories de triage dans le cas d'une situation d'urgence en utilisant la fluorescence globale de γ H2AX au point de 4 heures post-irradiation permet la création de ces catégories de triage indépendamment de la radiosensibilité individuelle (Section 2), il permet de s'affranchir de la question de classement des individus en fonction de leur radiosensibilité. Bien que cette méthode soit rapide et capable d'analyse à haut débit (à la fois crucial dans le cas d'un accident de masse), cette analyse est entravée par la nature sensible au temps de la mesure de γ H2AX.

Dans le contexte de la radiothérapie, ainsi que le souligne (Mirjolet et al., 2015), la capacité de prédire de façon fiable la radiosensibilité individuelle pourrait permettre la personnalisation du traitement. En outre, comme la radiosensibilité a été associée à la longueur des télomères et à l'activité de la télomérase, la gestion des longueurs de télomères et de la télomérase pourrait être utile en radiothérapie. En générale, les longueurs des télomères plus courtes ont été liées à une augmentation de la radiosensibilité dans plusieurs études *in vivo* et *in vitro* chez les souris et les cellules humaines déficientes en

téломérase. Il a été montré que la régulation négative ou l'inhibition de la téломérase compromettrait la viabilité des cellules cancéreuses tout en minimisant l'effet sur les cellules normales ; ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs de la téломérase lors de chimiothérapie ou radiothérapie peut rendre les cellules cancéreuses plus sensibles aux traitements. D'autre part, les cellules cancéreuses radiorésistantes montrent une régulation positive de l'activité de la téломérase et des téломères plus longs (Genesca et al., 2006; Ayoub et al., 2008; Shim et al., 2014). Dans le cadre des traitements personnalisés de radiothérapie basée sur la radiosensibilité individuelle, les auteurs Mirjolet *et al* proposent que les longueurs de téломères et des protéines shelterin dans les cellules cancéreuses (pour évaluer la sensibilité de la tumeur) et dans les cellules normales (pour évaluer la tolérance à la radiothérapie des tissus sains) puissent être utilisées. La longueur des téломères peut être utilisée pour ajuster les doses par fraction, ce qui permettrait d'améliorer l'efficacité et la sûreté de la radiothérapie en utilisant des traitements pharmacologiques interférant avec la biologie des téломères (par exemple, réduire la longueur des téломères) dans les cellules tumorales (Mirjolet et al., 2015).

Comme nous avons constaté que la radiosensibilité pourrait être prédite par une combinaison de l'âge et du sexe, ainsi que la combinaison de la longueur intrinsèque des téломères et de leurs modifications radio-induites, nous proposons que ces facteurs peuvent être adaptés pour établir une méthode clinique de l'identification des personnes radiosensibles. Dans les prochains mois, nous prévoyons de confirmer ces corrélations entre la radiosensibilité individuelles et les longueurs des téломères dans les lymphocytes du sang périphérique d'une cohorte d'au moins de 30 donneurs (dans une étude ad hoc avec un financement approuvé de DoReMi). Cette cohorte sera choisie parmi une bio-banque précédemment établie pour un projet distinct (EpiRadBio). Comme la longueur moyenne intrinsèque des téломères a déjà été déterminées pour le projet EpiRadBio, les donneurs représentant les extrémités en termes de longueur des téломères seront sélectionnés et soumis à l'exposition *in vitro*. La longueur des téломères sera déterminée par hybridation FISH avec des sondes télomériques PNA avant et après irradiation, et sera analysée par capture et analyse d'images automatisées. Les métaphases seront également hybridées par TC-FISH, et la radiosensibilité des lymphocytes du sang périphérique seront déterminés en termes de cassures double-brin par cellule suivants l'analyse automatisée avec le logiciel (TCScore) développé dans notre laboratoire (déjà discuté dans la Section 3, et présenté dans l'article (M'Kacher et al., 2014)).

Les téломères, longtemps considérés comme les gardiens du génome, peuvent indiquer l'état de santé général d'un individu, car ils peuvent représenter toutes les expositions aux divers agents nocifs envers l'ADN, y compris les rayonnements ionisants

(comme ils sont déficients en réparation et donc conduit à l'accumulation de dommages) de toute une vie. Les télomères et les mécanismes de leur maintien pourraient donc avoir des implications importantes en matière de santé humaine à long terme. Comme les êtres humains sont constamment exposés aux rayonnements ionisants via des sources naturelles et artificielles, il est importante de déterminer si et comment les télomères jouent un rôle dans les mécanismes des effets biologiques radio-induits directs et indirects, ainsi que leur rôle dans la transmission de ces effets radio-induits lors de la prolifération cellulaire. Ces rôles sont peut-être critiques pour la détermination des effets radio-induits à long terme sur la santé humaine, et peuvent contribuer à une meilleure compréhension des cancers radio-induits associés à d'autres pathologies humaines.

BIBLIOGRAPHIE

Advisory Group on Ionising Radiation (2013). "Human radiosensitivity", in: *Report of the Independent Advisory Group on Ionising Radiation*. (Chilton: Health Protection Agency).

Andreassi, M.G., Piccaluga, E., Gargani, L., Sabatino, L., Borghini, A., Faita, F., Bruno, R.M., Padovani, R., Guagliumi, G., and Picano, E. (2015). Subclinical carotid atherosclerosis and early vascular aging from long-term low-dose ionizing radiation exposure: a genetic, telomere, and vascular ultrasound study in cardiac catheterization laboratory staff. *JACC Cardiovasc Interv* 8, 616-627. doi: 10.1016/j.jcin.2014.12.233.

Andrievski, A., and Wilkins, R.C. (2009). The response of gamma-H2AX in human lymphocytes and lymphocytes subsets measured in whole blood cultures. *Int J Radiat Biol* 85, 369-376. doi: 10.1080/09553000902781147.

Armanios, M., and Blackburn, E.H. (2012). The telomere syndromes. *Nat Rev Genet* 13, 693-704. doi: 10.1038/nrg3246.

Ayouaz, A., Raynaud, C., Heride, C., Revaud, D., and Sabatier, L. (2008). Telomeres: hallmarks of radiosensitivity. *Biochimie* 90, 60-72. doi: 10.1016/j.biochi.2007.09.011.

Azzam, E.I., Jay-Gerin, J.P., and Pain, D. (2012). Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett* 327, 48-60. doi: 10.1016/j.canlet.2011.12.012.

Balasubramanyam, M., Adaikalakoteswari, A., Monickaraj, S.F., and Mohan, V. (2007). Telomere shortening & metabolic/vascular diseases. *Indian J Med Res* 125, 441-450.

Castellino, S.M., Geiger, A.M., Mertens, A.C., Leisenring, W.M., Tooze, J.A., Goodman, P., Stovall, M., Robison, L.L., and Hudson, M.M. (2011). Morbidity and mortality in long-term survivors of Hodgkin lymphoma: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Blood* 117, 1806-1816. doi: 10.1182/blood-2010-04-278796.

Counter, C.M., Avilion, A.A., Lefevre, C.E., Stewart, N.G., Greider, C.W., Harley, C.B., and Bacchetti, S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* 11, 1921-1929.

Counter, C.M., Botelho, F.M., Wang, P., Harley, C.B., and Bacchetti, S. (1994). Stabilization of short telomeres and telomerase activity accompany immortalization of Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes. *J Virol* 68, 3410-3414.

D'adda Di Fagagna, F., Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P., and Jackson, S.P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426, 194-198. doi: 10.1038/nature02118.

Denekamp, J., Waites, T., and Fowler, J.F. (1997). Predicting realistic RBE values for clinically relevant radiotherapy schedules. *Int J Radiat Biol* 71, 681-694.

Ducray, C., Pommier, J.P., Martins, L., Boussin, F.D., and Sabatier, L. (1999). Telomere dynamics, end-to-end fusions and telomerase activation during the human fibroblast immortalization process. *Oncogene* 18, 4211-4223. doi: 10.1038/sj.onc.1202797.

Friedrich, T., Scholz, U., Durante, M., and Scholz, M. (2014). RBE of ion beams in hypofractionated radiotherapy (SBRT). *Phys Med* 30, 588-591. doi: 10.1016/j.ejmp.2014.04.009.

Genesca, A., Martin, M., Latre, L., Soler, D., Pampalona, J., and Tusell, L. (2006). Telomere dysfunction: a new player in radiation sensitivity. *Bioessays* 28, 1172-1180. doi: 10.1002/bies.20501.

Gilson, E., and Londono-Vallejo, A. (2007). Telomere length profiles in humans: all ends are not equal. *Cell Cycle* 6, 2486-2494.

Girinsky, T., M'kacher, R., Lessard, N., Koscielny, S., Elfassy, E., Raoux, F., Carde, P., Santos, M.D., Margainaud, J.P., Sabatier, L., Ghalibafian, M., and Paul, J.F. (2014). Prospective coronary heart disease screening in asymptomatic Hodgkin lymphoma patients using coronary computed tomography angiography: results and risk factor analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 89, 59-66. doi: 10.1016/j.ijrobp.2014.01.021.

Hamasaki, K., Imai, K., Nakachi, K., Takahashi, N., Kodama, Y., and Kusunoki, Y. (2007). Short-term culture and gammaH2AX flow cytometry determine differences in individual radiosensitivity in human peripheral T lymphocytes. *Environ Mol Mutagen* 48, 38-47. doi: 10.1002/em.20273.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

Harley, C.B., Futcher, A.B., and Greider, C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458-460. doi: 10.1038/345458a0.

Hartel, C., Nikoghosyan, A., Durante, M., Sommer, S., Nasonova, E., Fournier, C., Lee, R., Debus, J., Schulz-Ertner, D., and Ritter, S. (2010). Chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes of prostate cancer patients treated with IMRT and carbon ions. *Radiother Oncol* 95, 73-78. doi: 10.1016/j.radonc.2009.08.031.

Hernandez, L., Terradas, M., Camps, J., Martin, M., Tusell, L., and Genesca, A. (2015). Aging and radiation: bad companions. *Aging Cell* 14, 153-161. doi: 10.1111/accel.12306.

Holohan, B., Wright, W.E., and Shay, J.W. (2014). Cell biology of disease: Telomeropathies: an emerging spectrum disorder. *J Cell Biol* 205, 289-299. doi: 10.1083/jcb.201401012.

IAEA (2002). "Preparedness and response for a nuclear or radiological emergency", in: *IAEA Safety Standards Series* (Vienna: International Atomic Energy Agency).

Ismail, I.H., Wadhra, T.I., and Hammarsten, O. (2007). An optimized method for detecting gamma-H2AX in blood cells reveals a significant interindividual variation in the gamma-H2AX response among humans. *Nucleic Acids Res* 35, e36. doi: 10.1093/nar/gkl1169.

Jackson, S.P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071-1078. doi: 10.1038/nature08467.

Jermann, M. (2014). Particle Therapy Statistics in 2013. *International Journal of Particle Therapy* 1, 40-43. doi: 10.14338/IJPT.14-editorial-2.1.

Joubert, A., Zimmerman, K.M., Bencokova, Z., Gastaldo, J., Chavaudra, N., Favaudon, V., Arlett, C.F., and Foray, N. (2008). 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* 84, 107-125. doi: 10.1080/09553000701797039.

Kamada, T., Tsujii, H., Blakely, E.A., Debus, J., De Neve, W., Durante, M., Jakel, O., Mayer, R., Orecchia, R., Potter, R., Vatrinsky, S., and Chu, W.T. (2015). Carbon ion radiotherapy in Japan: an assessment of 20 years of clinical experience. *Lancet Oncol* 16, e93-e100. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70412-7.

Kaul, Z., Cesare, A.J., Huschtscha, L.I., Neumann, A.A., and Reddel, R.R. (2012). Five dysfunctional telomeres predict onset of senescence in human cells. *EMBO Rep* 13, 52-59. doi: 10.1038/embor.2011.227.

Komarova, N.L., and Wodarz, D. (2004). The optimal rate of chromosome loss for the inactivation of tumor suppressor genes in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7017-7021. doi: 10.1073/pnas.0401943101.

Lapham, K., Kvale, M.N., Lin, J., Connell, S., Croen, L.A., Dispensa, B.P., Fang, L., Hesselson, S., Hoffmann, T.J., Iribarren, C., Jorgenson, E., Kushi, L.H., Ludwig, D., Matsuguchi, T., Mcguire, W.B., Miles, S., Quesenberry, C.P., Jr., Rowell, S., Sadler, M., Sakoda, L.C., Smethurst, D., Somkin, C.P., Van Den Eeden, S.K., Walter, L., Whitmer, R.A., Kwok, P.Y., Risch, N., Schaefer, C., and Blackburn, E.H. (2015). Automated Assay of Telomere Length Measurement and Informatics for 100,000 Subjects in the Genetic Epidemiology Research on Adult Health and Aging (GERA) Cohort. *Genetics* 200, 1061-1072. doi: 10.1534/genetics.115.178624.

Lin, J., Epel, E., and Blackburn, E. (2012). Telomeres and lifestyle factors: roles in cellular aging. *Mutat Res* 730, 85-89. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.08.003.

M'kacher, R., Girinsky, T., Colicchio, B., Ricoul, M., Dieterlen, A., Jeandidier, E., Heidingsfelder, L., Cuceu, C., Shim, G., Frenzel, M., Lenain, A., Morat, L., Bourhis, J., Hempel, W.M., Koscielny, S., Paul, J.F., Carde, P., and Sabatier, L. (2015). Telomere shortening: a new prognostic factor for cardiovascular disease post-radiation exposure. *Radiat Prot Dosimetry* 164, 134-137. doi: 10.1093/rpd/ncu296.

M'kacher, R., Maalouf, E.E., Ricoul, M., Heidingsfelder, L., Laplagne, E., Cuceu, C., Hempel, W.M., Colicchio, B., Dieterlen, A., and Sabatier, L. (2014). New tool for biological dosimetry: reevaluation and automation of the gold standard method following telomere and centromere staining. *Mutat Res* 770, 45-53. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2014.09.007.

Mirjolet, C., Boidot, R., Saliques, S., Ghiringhelli, F., Maingon, P., and Crehange, G. (2015). The role of telomeres in predicting individual radiosensitivity of patients with cancer in the era of personalized radiotherapy. *Cancer Treat Rev* 41, 354-360. doi: 10.1016/j.ctrv.2015.02.005.

Morgan, W.F., and Sowa, M.B. (2015). Non-targeted effects induced by ionizing radiation: mechanisms and potential impact on radiation induced health effects. *Cancer Lett* 356, 17-21. doi: 10.1016/j.canlet.2013.09.009.

Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2007). A backup DNA repair pathway moves to the forefront. *Cell* 131, 223-225. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.005.

Pommier, J.P., Lebeau, J., Ducray, C., and Sabatier, L. (1995). Chromosomal instability and alteration of telomere repeat sequences. *Biochimie* 77, 817-825. doi: 0300-9084(96)88201-0 [pii].

Pommier, J.P., and Sabatier, L. (2002). Telomere length distribution. Digital image processing and statistical analysis. *Methods Mol Biol* 191, 33-63. doi: 10.1385/1-59259-189-2:33.

Price, L.H., Kao, H.T., Burgers, D.E., Carpenter, L.L., and Tyrka, A.R. (2013). Telomeres and early-life stress: an overview. *Biol Psychiatry* 73, 15-23. doi: 10.1016/j.biopsych.2012.06.025.

Raynaud, C.M., Sabatier, L., Philipot, O., Olaussen, K.A., and Soria, J.C. (2008). Telomere length, telomeric proteins and genomic instability during the multistep carcinogenic process. *Crit Rev Oncol Hematol* 66, 99-117. doi: 10.1016/j.critrevonc.2007.11.006.

Rea, M.E., Gougelet, R.M., Nicolalde, R.J., Geiling, J.A., and Swartz, H.M. (2010). Proposed triage categories for large-scale radiation incidents using high-accuracy biodosimetry methods. *Health Phys* 98, 136-144. doi: 10.1097/HP.0b013e3181b2840b.

Roch-Lefevre, S., Mandina, T., Voisin, P., Gaetan, G., Mesa, J.E., Valente, M., Bonnesoeur, P., Garcia, O., Voisin, P., and Roy, L. (2010). Quantification of gamma-H2AX foci in human lymphocytes: a method for biological dosimetry after ionizing radiation exposure. *Radiat Res* 174, 185-194. doi: 10.1667/RR1775.1.

Roch-Lefèvre, S., Valente, M., Voisin, P., and Barquinero, J.F. (2012). *Suitability of the γ -H2AX Assay for Human Radiation Biodosimetry*. InTech.

Rothkamm, K., and Horn, S. (2009). gamma-H2AX as protein biomarker for radiation exposure. *Ann Ist Super Sanita* 45, 265-271.

Sabatier, L., Lebeau, J., and Dutrillaux, B. (1995). Radiation-induced carcinogenesis: individual sensitivity and genomic instability. *Radiat Environ Biophys* 34, 229-232.

Sabatino, L., Picano, E., and Andreassi, M.G. (2012). Telomere shortening and ionizing radiation: a possible role in vascular dysfunction? *Int J Radiat Biol* 88, 830-839. doi: 10.3109/09553002.2012.709307.

Schlaff, C.D., Krauze, A., Belard, A., O'connell, J.J., and Camphausen, K.A. (2014). Bringing the heavy: carbon ion therapy in the radiobiological and clinical context. *Radiat Oncol* 9, 88. doi: 10.1186/1748-717X-9-88.

Schmitz, A., Bayer, J., Dechamps, N., and Thomas, G. (2003). Intrinsic susceptibility to radiation-induced apoptosis of human lymphocyte subpopulations. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 57, 769-778.

Shim, G., Ricoul, M., Hempel, W.M., Azzam, E.I., and Sabatier, L. (2014). Crosstalk between telomere maintenance and radiation effects: A key player in the process of radiation-induced carcinogenesis. *Mutat Res Rev Mutat Res*. doi: 10.1016/j.mrrev.2014.01.001.

Specht, L., Yahalom, J., Illidge, T., Berthelsen, A.K., Constine, L.S., Eich, H.T., Girinsky, T., Hoppe, R.T., Mauch, P., Mikhaeel, N.G., Ng, A., and Ilrog (2014). Modern radiation therapy for Hodgkin lymphoma: field and dose guidelines from the international lymphoma radiation oncology group (ILROG). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 89, 854-862. doi: 10.1016/j.ijrobp.2013.05.005.

Takahashi, A., and Ohnishi, T. (2005). Does gammaH2AX foci formation depend on the presence of DNA double strand breaks? *Cancer Lett* 229, 171-179. doi: 10.1016/j.canlet.2005.07.016.

Takai, H., Smogorzewska, A., and De Lange, T. (2003). DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol* 13, 1549-1556.

Tommasino, F., and Durante, M. (2015). Proton radiobiology. *Cancers (Basel)* 7, 353-381. doi: 10.3390/cancers7010353.