Impact du transit cytonucléaire de la protéine ATM en réponse aux radiations ionisantes : notions de pro- et anti-episkévie

Mélanie Ferlazzo

▶ **To cite this version:**

Mélanie Ferlazzo. Impact du transit cytonucléaire de la protéine ATM en réponse aux radiations ionisantes : notions de pro- et anti-episkévie. Cancer. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSE1067 . tel-01588173

HAL Id: tel-01588173
https://theses.hal.science/tel-01588173

Submitted on 15 Sep 2017

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 NNT : 2017LYSE1067

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
L'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale ED 340
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

Spécialité de doctorat : Cancérologie
Discipline : Radiobiologie

Soutenue publiquement le 18/04/2017, par :
Mélanie L. Ferlazzo

Impact du transit cytonucléaire de la protéine ATM en réponse aux radiations ionisantes : notions de pro- et anti-episkévie.

Devant le jury composé de :

Dr. Lamartine Jérôme, IBCP/UCBL Lyon, France.	Président
Dr. Baatout, Sarah, Belgian Nuclear Research Centre, Mol, Belgique.	Rapporteure
Pr. Lambin, Philippe, Maastro Lab, Maastricht, Pays Bas.	Rapporteur
Dr. Uhrhammer, Nancy, Centre Jean Perrin, Clermont Ferrand, France.	Examinatrice
Dr. Grégoire, Marie-Claude, ANSTO, Lucas Heights, Australie.	Examinatrice
Dr. Foray, Nicolas, INSERM, Lyon, France.	Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. le Professeur Frédéric FLEURY**
Président du Conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉE
Directrice Générale des Services	Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur G.RODE
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. X. PERROT
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. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C 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. le Professeur E.PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Ce travail est le fruit de nombreuses collaborations, issues de divers horizons scientifiques, entamées bien avant le début de cette thèse. En effet, j'ai rejoint le groupe de radiobiologie il y a maintenant 8 ans et j'espère n'oublier personne en rédigeant ces remerciements alors que l'écriture de ce manuscrit s'achève.

Tout d'abord j'adresse mes premiers remerciements à Nicolas Foray, mon directeur de thèse. Il n'est pas aisé de trouver les mots pour décrire tout ce que tu as fait pour moi durant toutes ces années, que cela soit pendant mes stages, mon année d'ingénieur ou pendant cette thèse. Et même si « *l'art de la citation est l'art de ceux qui ne savent pas réfléchir par eux-mêmes »*, je pense que, comme le dit Oliver Sax, « *le respect et l'admiration sont meilleurs moteurs que le stress, la sanction ou l'incompréhension. »* Tu as su rendre agréables et productives toutes ces années qui ne sont pas toujours faciles pour d'autres. Personne n'aurait pu m'apprendre autant et je t'en serai éternellement reconnaissante.

Je remercie Sarah Baatout et Philippe Lambin, pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail ainsi que Nancy Uhrhammer et Marie-Claude Grégoire pour avoir accepté d'être examinatrices.
Marie-Claude vous m'avez accueilli dans votre laboratoire en Australie lors d'un stage effectué en 2016. J'ai pu faire la connaissance de votre équipe et j'espère que cette collaboration continuera. Transmettez (et surtout traduisez !) mes remerciements les plus sincères et chaleureux à Jun Liu Guo qui a supervisé mon travail là-bas et Calina avec qui j'ai pu partager de bons moments autour d'une paillasse ou d'un bon repas.
Cette collaboration n'aurait pu avoir lieu sans le soutien de Michel Bourguignon que je remercie ici.
Enfin je remercie Jérôme Lamartine pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury.

Je tiens à remercier tous les collaborateurs ayant contribué à la réalisation de ce travail :

Constance Bochot, Laurent Charlet et le Canceropôle Lyon Rhône-Alpes, pour les travaux concernant les métaux et les pesticides. Patrick Combemale et l'association ANR France pour leur collaboration sur le projet concernant la Neurofibromatose de type I.
Je remercie aussi le service de radiothérapie du centre Léon Berrard et les manipulateurs en électroradiologie nous garantissant l'accès aux irradiateurs médicaux et sans qui toutes ces expériences n'auraient pu avoir lieu.
Merci aussi à Nicole Dalla Venezia, Anne Vincent et Élise Berthel pour nous avoir hébergés un temps pour les expériences de biochimie.

Les membres du groupe de radiobiologie ont aussi grandement contribué à la réalisation de ce travail, que cela soit par leur assistance technique, morale et leur amitié.
Adeline, Clément et Muriel, il y a 8 ans vous êtes les premières personnes que j'ai rencontrées après Nicolas. Vous m'avez formée aux techniques utilisés dans le laboratoire et apportée votre aide. Laurène, tu as été d'une aide précieuse pour le chapitre sur la génotoxicité.
Larry, ton expertise sur le versant mathématique ainsi que nos discussions scientifico-gastronomiques furent d'une grande aide.
Manon, ton parcours différent du mien a pu apporter un regard nouveau sur les problématiques que j'ai pu rencontrer.
Ce travail est aussi le votre, merci.

Merci aussi à tous les membres de Neolys Diagnostics qui ont pu m'aider durant toutes ces années et surtout à Sandrine, avec qui j'ai pu collaborer sur le projet concernant la Progéria. Ton expérience et ta disponibilité sont une grande source d'inspiration. Merci aussi à Aurélie pour les manips tardives et la musique.

Merci à Fabien pour ces quelques années ou nous avons partagé le même bureau et le même esprit tordu...

Sur un ton plus léger, merci aussi pour toutes les soirées ciné, séries ou dans les bars, train, restaurants, sur les quais et toutes les autres joyeusetés que peut nous offrir la belle ville de Lyon.

Je remercie aussi tous les stagiaires qui ont contribué de près ou de loin aux travaux présentés dans cette thèse.
Et merci à Basma pour son efficacité dans la gestion des problèmes logistiques.

J'adresse mes remerciements à Martine et René Mornex avec qui j'ai pu travailler sur un projet annexe à cette thèse. Nos discussions ont renforcé mon gout pour l'histoire des sciences et de la médecine déjà amorcé par Nicolas.

Mes pensées se dirigent à présent vers mes proches qui ont su me soutenir tout au long de cette thèse.
Tout d'abord j'aimerai remercier mes amis.
Sylvie, Clément, vous êtes passés par là avant moi et je n'ai pas besoins de vous dire combien votre soutien est précieux, dans les bons moments comme dans les moments plus difficiles.
Laurie, Marine, Jean et Christophe, nous nous sommes aussi rencontrés à la fac et même si nos chemins professionnels se sont séparés, le souvenir de ces bons moments m'accompagne chaque jour.
Florian, JB, Laurie, Rémi, Caroline, Romain, Coline, nos réunions sont une bouffée d'air frais à chaque fois.
Zoé, même si nous ne nous voyons pas souvent, tu es la personne que je connais depuis le plus longtemps en dehors des membres de ma famille.
Olivier, tu as été mon prof de SVT au collège, tu n'es peut-être pas étranger au fait que j'en sois arrivée ici.

Je finirai enfin par remercier ma famille sans qui je ne serai pas là (cela peut sembler très cliché mais c'est pourtant vrai...)
Mes plus grands remerciements vont évidement à mes parents, qui par leur dévouement et leur amour m'ont facilité beaucoup les choses et m'ont permis de me focaliser sur mon travail. Je sais que vous êtes là pour moi et cela n'a pas de prix.
Je tiens aussi à remercier ma sœur et mes grands parents qui sont aussi de grands soutiens personnels et qui ont su être présents quand il fallait.
Merci aussi à ma tante et mon oncle qui m'ont fourni toit et nourriture lors de mon année de Master à Paris. Sans compter la substantielle économie que cela m'a

permis de faire, ces quatre mois passés chez vous furent des plus agréables nous ont permis de nous rapprocher.

Je remercie toutes les autres personnes qui ont pu faire que ces années de travail se soient passées dans les meilleures conditions possibles, qu'ils soient amis, proches ou collaborateurs d'un jour.

Pour finir, je remercie tous les lecteurs qui auront le courage de lire ce manuscrit.

Merci.

Your life is your life
Don’t let it be clubbed into dank submission. (...)

Charles Bukowski, The Laughing Heart, Circa, 1993.

RESUMÉ

Plus d'un siècle après la découverte des rayons X, les effets biologiques des radiations ionisantes restent encore méconnus. En particulier, une meilleure connaissance des phénomènes liés à la radiosensibilité individuelle permettrait une meilleure prédiction du risque radioinduit tant en ce qui concerne les réactions tissulaires que la formation de cancers.

Dans le cadre des recherches menées par le Groupe de Radiobiologie de l'UMR 1052 Inserm (Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon), l'accumulation de données radiobiologiques issues de patients radiosensibles a permis d'initier une théorie basée sur le transit cytonucléaire de la protéine ATM. Acteur majeur de la réponse aux radiations ionisantes la protéine ATM est mutée dans l'Ataxie Telangiectasie, syndrome génétique rare associé à la plus forte radiosensibilité connue chez l'homme. Le modèle suivant à été proposé : - l'irradiation produit une monomérisation des formes cytoplasmiques de la protéine ATM. - Les monomères d'ATM diffusent dans le noyau pour assurer la reconnaissance et la réparation des cassures double-brin de l'ADN (CDB), dommages-clés de la réponse aux radiations. - Tout retard dans ce transit conduirait à une certaine radiosensibilité.

Le but de cette thèse est d'identifier d'une part, les protéines (appelées X) qui pourraient freiner ce transit en s'associant à ATM dans le cytoplasme ; d'autre part, les agents chimiques (métaux, pesticides) qui pourraient agir sur ce processus.

Les protéines X identifiées dans le cadre de cette thèse sont notamment la huntingtine, la neurofibromine, la tubérine, la progérine qui, lorsqu'elles sont mutées, causent respectivement la maladie de Huntington, la Neurofibromatose de type 1, la Tubéreuse de Bourneville et le syndrome progéroide de Hutchinson-Gilford. Les métaux étudiés sont les chlorures d'aluminium, de cuivre, de zinc, de fer, de nickel, de palladium, de cadmium ainsi que le nitrate de plomb, le selenium et le chrome. Les résultats préliminaires concernant les pesticides traitent de l'atrazine, du glyphosate, de la permethrine, du thiabendazole et du pentachlorophénol.

Cette thèse introduit la notion de pro- et d'anti-épiskévie, c'est-à-dire la capacité de certains agents, protéines ou drogues à accélérer, ralentir ou interdire le transit cytonucléaire de la protéine ATM.

Mots clefs : radiosensibilité, cassures double-brin, ATM, H2AX, radiations ionisantes, metaux, pesticides, maladie de Huntington, neurofibromatose de type 1, Tubéreuse de Bourneville, Hutchinson-Gilford.

ABSTRACT

More than a century after the discovery of X rays, the effects of ionising radiation are still misunderstood. In particular, a better knowledge of individual radiosensitivity could lead to a better prediction of radio induced risk of cancer and acute reactions after radiotherapy.

As part of the research conducted by the Radiobiology Group of UMR Inserm 1052 (Cancer Research Center of Lyon), the accumulation of radiobiological data from radiosensitive patients allowed to initiate a theory based on the ATM protein transit from cytoplasm to nucleus. ATM is the major actor in the response to ionising radiation and is mutated in Ataxia Telangiectasia, a rare genetic syndrome associated with the highest radiosensitivity. Specifically, the researchers of the Group proposed the following model: irradiation produces monomerization of cytoplasmic forms of ATM protein. ATM monomers diffuse into the nucleus to ensure the recognition and repair of DNA double-strand breaks (DSBs), the key damage response to radiation. Any delay in this transit would lead to radiosensitivity.

The aim of this thesis is to identify in one hand, the proteins (called X proteins), which would slow the transit by interracting with ATM in the cytoplasm; on the other hand, chemical agents (metals, pesticides) that would affect this process.

X proteins identified in this thesis include huntingtin, neurofibromin, tuberin and progerin which, when mutated, cause, respectively, Huntington's disease, Neurofibromatosis type 1 Tuberous Sclerosis and Hutchinson-Gilford syndrome. Studied metals are aluminum, copper, zinc, iron, nickel, palladium and cadmium chlorides, lead nitrate, selenium and chromium. Preliminary data on pesticides are about atrazine, glyphosate, permethrin, thiabendazole and pentachlorophenol.

This thesis introduces the concept of pro- and anti- episkévia, that is to say the ability of some agents, proteins or drugs to speed up, slow down or inhibit the the ATM nucleoshuttling.

Key words : radiosensitivity, double-strand breaks, ATM, H2AX, ionising radiation, metals, pesticides, Huntington’disease, Neurofibromatosis type 1, Tuberous Sclerosis, Hutchinson-Gilford syndrome

TABLE DES MATIERES

Remerciements *5*
RESUMÉ *11*
ABSTRACT *13*
TABLE DES MATIERES *15*
LISTE DES ABREVIATIONS 19

1. RAPPELS DE RADIOBIOLOGIE CELLULAIRE 23

1.1 DES DEPOTS D'ENERGIE AUX DOMMAGES DE L'ADN 23
1.1.1 Qu'est-ce qu'un rayonnement ionisant ? *23*
1.1.2 Evénements physiques radioinduits *24*
1.1.3 La radiolyse de l'eau *26*
1.1.4 Les différents dommages radioinduits de l'ADN *28*
1.2 PREDOMINANCE DES CDB DANS LA LETALITE CELLULAIRE 32
1.2.1 Généralité sur les techniques de mesure des CDB *33*
1.2.2 Induction des CDB *35*
1.2.3 Reconnaissance et signalisation des CDB *35*
1.2.4 Réparation des CDB *37*
1.2.5 Rôle de ATM dans la réponse aux dommages *41*
1.2.6 Diffusion d'une protéine à travers une la membrane nucléaire *44*
1.3 LA SURVIE CELLULAIRE 47
1.3.1 La mort radiobiologique *47*
1.3.2 La technique de référence en radiobiologie *48*
1.3.3 Les trois types de morts de cellulaire *49*
1.3.4 Représentation mathématique de la mort clonogénique en fonction de la dose *51*
1.3.5 Contribution de l'apoptose dans la létalité cellulaire *52*
1.4 L'HYPERSENSIBILITE AUX FAIBLES DOSES 53
1.4.1 Principes généraux *53*

2. RADIOBIOLOGIE CLINIQUE 55

2.1 HISTORIQUE DE LA RADIOSENSIBILITE INDIVIDUELLE 55
2.1.1 Radiosensibilité : histoire d'un mot *55*
2.1.2 Réaction tissulaire ou cancer radioinduit ? *55*
2.1.3 Radiosensibilité individuelle : 100 ans d'évidence *56*
2.1.4 Radiosensibilité : son existence et son importance *58*
2.1.5 Radiosensibilité ou erreur de dosimétrie ? *59*
2.2 REACTIONS TISSULAIRES RADIOINDUITES 62
2.2.1 Réactions précoces ou tardives ? *62*
2.2.2 Echelles de sévérité des réactions tissulaires *63*
2.3 SYNDROMES ASSOCIES A UNE RADIOSENSIBILITE 63

2.3.1 Maladies de la signalisation ATM/ATR *64*
2.3.2 Maladies de la réparation par suture *65*
2.3.3 Maladies de la recombinaison non-homologue *66*
2.3.4 Les syndromes progéroïdes *67*
2.3.5 Maladies des protéines-supports *68*
2.3.6 Autres syndromes liés à une radiosensibilité *69*
2.3.7 Syndromes radiosensibles non-réparatoses *69*

3. APPROCHE GENERALE DU LABORATOIRE 73

3.1 JUSTIFICATION DES CHOIX TECHNIQUES 73
3.1.1 Choix des tests fonctionnels de réparation des CDB *73*
3.1.2 Choix des modèles cellulaires humains *74*
3.2 LES ACQUIS DU LABORATOIRE DEPUIS 2003 76
3.2.1 Corrélation entre toxicité et CDB non réparées *76*
3.2.2 Genèse du modèle du transit cyto-nucléaire d'ATM *78*
3.2.3 Interprétation biologique du modèle LQ *80*

4. BUT DE LA THESE 87

5. RESULTATS 91

5.1 ARTICLE B : LA RADIOSENSIBILITE CLINIQUE ET LE TRANSIT D'ATM 91
5.1.1 Contexte *91*
5.1.2 Résumé des résultats *92*
5.1.3 Discussion *99*
5.1.4 Conclusions et perspectives *100*
5.2 ARTICLE I : LA MALADIE DE HUNTINGTON ET LE TRANSIT D'ATM 101
5.2.1 Contexte *101*
5.2.2 Résumé des résultats *102*
5.2.3 Discussion *108*
5.2.4 Conclusion et perspectives *109*
5.3 ARTICLE III : LA NEUROFIBROMATOSE DE TYPE 1 ET LE TRANSIT D'ATM 111
5.3.1 Contexte *111*
5.3.2 Résumé des résultats *111*
5.3.3 Discussion *116*
5.3.4 Conclusions et Perspectives *116*
5.4 ARTICLE IV : LA TUBEREUSE DE BOURNEVILLE ET LE TRANSIT D'ATM 117
5.4.1 Contexte *117*
5.4.2 Résumé des résultats *117*
5.4.3 Discussion *123*
5.4.4 Conclusions et Perspectives *123*
5.5 ARTICLE V : LE SYNDROME HUTCHINSON-GIRLFORD ET LE TRANSIT D'ATM 124

5.5.1 Contexte *124*
5.5.2 Résumé des résultats *124*
5.5.3 Discussion *126*
5.5.4 Conclusion et perspectives *127*
5.6 ARTICLE VI : METAUX ET TRANSIT D'ATM 128
5.6.1 Contexte *128*
5.6.2 Résumé des résultats *128*
5.6.3 Discussion *133*
5.6.4 Conclusions et perspectives *133*
5.7 PESTICIDES ET TRANSIT D'ATM (ARTICLE EN PREPARATION) 134
5.7.1 Contexte *134*
5.7.2 Résultats préliminaires et conclusions *134*
5.7.3 Perspectives *135*
5.8 RESUME DE LA REVUE A : 136
5.9 RESUME DE LA REVUE C : 136
5.10 COMMENTAIRE D'ARTICLE ET CHAPITRE D'OUVRAGE 137

6. DISCUSSION GENERALE 139

6.1 A LA RECHERCHE DES RADIOSENSIBILITES INTERMEDIAIRES 139
6.2 UN MODELE BASE SUR LE TRANSIT D'ATM 140
6.2.1 ATM, protéine nucléaire ou cytoplasmiques ? *140*
6.2.2 Le transit d'ATM, une question de dynamique *141*
6.2.3 Le transit d'ATM : l'importance de l'accumulation de données *141*
6.3 LES PROTEINES X 144
6.3.3 Premières définitions *144*
6.3.2 Protéines X et groupe II : a-t-on recensé tous les cas ? *145*
6.4 NOTIONS DE PRO- ET D'ANTI-EPISKEVIE 148
6.5 ACTION ANTI-EPISKEVIQUE DES METAUX ET PESTICIDES 149
6.5.1 Les métaux *149*
6.5.2 Les pesticides *151*

CONCLUSIONS – PERSPECTIVES 153

BIBLIOGRAPHIE *155*
ANNEXES 183

LISTE DES ABREVIATIONS[1]

ADN : acide désoxyribonucléique

AFAS : Association Française pour l'Avancement des Sciences

ANOVA : analyse de la variance

ANSM : Agence Nationale de la Sécurité du Médicament

ASN : Autorité de Sureté Nucléaire

AT : ataxie télangiectasie

ATLD : ataxia telangiectasia-like disorder

ATH : porteurs hétérozygotes de l'AT

ATV : forme variante de l'AT

CDB : cassure double-brin de l'ADN

CIPR : Commission Internationale de Protection Radiologique

CS : syndrome de Cokayne (Cockayne's syndrome)

CSB : cassure simple-brin de l'ADN

CTCAE : Common Terminology Criteria for Adverse Effects

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DB : dommage de base

FA : Anémie de Fanconi (Fanconi Anemia)

FCE : fragments chromosomiques non réparés en excès

FISH : fluorescence in situ hybridization

γH2AX : formes phosphorylées de l'histone variant H2AX

HGPS : Hutchinson-Gilford Progeroid Syndrome

HNPCC : Hereditary non-polyposis colon cancer

HRS : hypersensibilité aux faibles doses

[1] Dans cette liste, le nom des protéines n'a pas été considéré comme une abréviation. Ne figurent pas non plus les unités du système international.

IgG : immunoglobuline G

IRR : résistante radioinduite

IRSN : Institut de Radioprotection et Sûreté Nucléaire

LENT : Late Effects in Normal Tissues

LMDS: localized multiple damage sites

LQ : linéaire quadratique

MAR : matrix attachment region (proteins)

MH : maladie de Huntington

MMR : mismatch repair

MPF: mitosis-promoting factors

MTT: bromure 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazolium

NBS : Nijmegen Breakge Syndrome

NBSLD: Nijmegen Breakage Syndrome-Like Disorder

NER : nucleotide excision resynthesis

NF1: neurofibromatose de type 1

NHEJ : non-homologous end-joining

NLS : Nuclear Localization Sites

OTAN : Organisation du Traité de l'Atlantique Nord

pATM : formes phosphorylées d'ATM

pATMmax : nombre maximal de foci pATM

pb : paires de bases

PCC : premature condensed chromosome

PFGE : Pulsed Field Gel Electrophoresis

RH : recombinaison homologue

RIDDLE : Radiosensitivity, ImmunoDeficiency, Dysmorphic features and Learning difficulties

ROC : receiver operating characteristics

RTOG : Radiation Therapy Oncology Group

SF2 : survival fraction at 2 Gy (fraction survivante à 2 Gy)

SFRO : Société Française de Radiothérapie Oncologique

SNP : single nucleotide polymorphism

TEL : transfert d'énergie linéique

TTD : trichothiodystrophie

UV : rayons ultraviolets

V(D)J : Variety (Diversity) Joining

WHO : World Health Organization

XP : Xeroderma Pigmentosum

ZOPRA : association zoledronate et pravastatine

I. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1. RAPPELS DE RADIOBIOLOGIE CELLULAIRE

La radiobiologie est l'étude des effets biologiques des radiations ionisantes, couvrant tous les aspects physiques, chimiques, moléculaires, cellulaires, tissulaires et même réglementaires de la réponse au rayonnement.

1.1 Des dépôts d'énergie aux dommages de l'ADN

1.1.1 Qu'est-ce qu'un rayonnement ionisant ?

Un rayonnement est dit ionisant s'il est susceptible d'ioniser une molécule d'air ou d'eau, c'est-à-dire s'il possède une énergie suffisante (à partir d'une énergie de 13 eV) pour arracher au moins un électron des couches périphériques des atomes de la matière irradiée (1,3,4). Ainsi, des particules d'au moins une dizaine d'eV peuvent ioniser la molécule d'eau directement (ex : les particules chargées comme les électrons, protons ou ions lourds) ou indirectement (ex : les particules non chargées comme les rayons X, gamma et les neutrons). Moins énergétiques, les rayons ultraviolets (UV) ne sont pas considérés comme ionisants même s'ils peuvent entraîner indirectement des cassures de l'ADN comme le font les rayonnements ionisants.

La nature des phénomènes radioinduits dépend de l'intervalle de temps qui suit l'irradiation : les phénomènes sont généralement physiques, chimiques puis biologiques. Ils évoluent de l'échelle microscopique (atomes, molécules, cellules) à l'échelle macroscopique (tissu ou organe, individu, populations). De 10^{-18} à 10^{-12} s après irradiation, les microdépôts d'énergie sont formés et aléatoirement répartis dans la matière. De 10^{-12} à 1 s, les ionisations induites par les microdépôts d'énergie entraînent des changements moléculaires à travers le phénomène dit de *radiolyse de l'eau* qui décrit la formation de certaines espèces chimiques généralement à fort

pouvoir oxydant (ex : radicaux hydroxyles OH°, superoxydes O_2^-) mais à durée de vie relativement limitée. Ensuite, se forment des produits de radiolyse plus stables comme notamment le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (appelé eau oxygénée) capables de casser l'ADN (5).

1.1.2 Evénements physiques radioinduits

1.1.2.1 Importance de l'effet Compton

On peut distinguer 3 effets d'interaction rayonnement-matière : l'effet photoélectrique, l'effet Compton et la création de paires (Figure 1). L'effet Compton est le mode principal d'interaction pour des photons d'énergies comprises entre 1 et 5 MeV. Pour des énergies plus basses, l'effet Compton prédomine aussi pour les matériaux légers (eau, composants organiques) (6). Un tel effet libérant à la fois un photon de recul et un électron produit respectivement excitations et ionisations du milieu irradié : on doit donc considérer un spectre de dépôts *d'énergie large et continu* et non discret et quantique. L'effet Compton est ainsi responsable de la diversité des événements radioinduits.

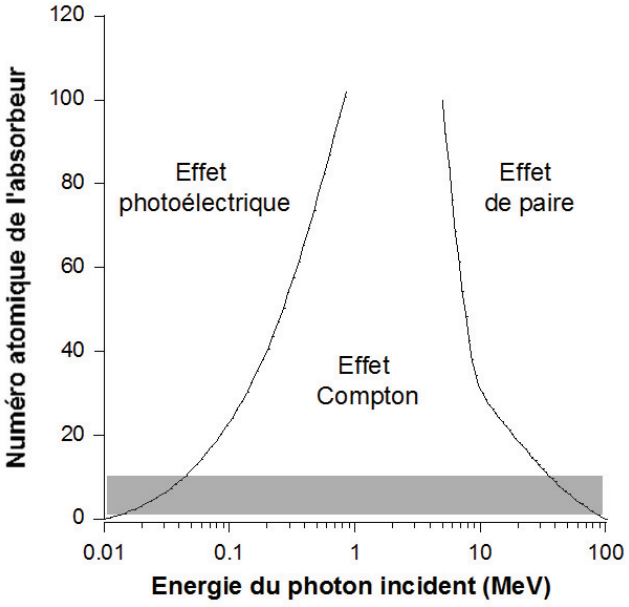


Figure 1 : *Importance relative des effets d'interaction rayonnement-matière en fonction de l'énergie. D'après (6). La zone grisée correspond aux numéros atomiques aux principaux composants organiques C, H, O N.*

1.1.2.2 Microdépôts d'énergie et notion de dose

Couramment utilisée en radiobiologie, la notion de dose absorbée, exprimée en Joules par kilogramme (Gray ; Gy) montre toutefois ses limites pour apprécier un effet biologique. En effet, comme on l'a dit plus haut, à l'échelle *microscopique,* l'énergie n'est pas délivrée de façon homogène mais *stochastique*, variant en nombre et en densité d'énergie sous la forme de *microdépôts d'énergie*, ce qui limite le champ de validation de la définition de la dose. (7)

Dans les années 1980, grâce à la méthode de Monte-Carlo, il a été possible de simuler des trajets de particules de l'ordre du nanomètre. En 1987, Ito montra que la probabilité que 2 radicaux hydroxyles diffusés atteignent des brins adjacents de l'ADN reste très faible et requiert des doses de l'ordre du MGy (c'est-à-dire 1 million de fois plus élevées que celles utilisées en radiothérapie !). Ainsi, plus de 98% des cassures double-brin de l'ADN (CDB) seraient causées par une peroxydation instantanée des 2 brins *: une CDB radioinduite ne peut donc pas être le résultat de 2 cassures simple-brin (CSB) produites l'une après l'autre* (13,14).

Dudley T. Goodhead fut l'un des premiers à s'intéresser aux microdépôts d'énergie. Les travaux de Goodhead ont conduit à plusieurs principes directement applicables aux radiations :

- le passage d'un photon dans le milieu biologique produit une arborescence de microdépôts d'énergie aléatoirement espacés et de densité d'énergie différente. La variété de ces microdépôts est probablement la cause de la grande hétérogénéité biochimique des dommages créés dans l'ADN.
- le facteur qui détermine l'efficacité biologique des radiations ionisantes est la densité d'ionisation (13). Les particules de faible transfert d'énergie linéique (TEL) déposent leur énergie sous forme d'ionisations dispersées. En revanche, les particules de haut TEL, comme les particules α, délivrent leur énergie sous forme d'une trace dense. Ainsi pour une dose de 1 Gy de radiation de faible TEL, on observe un très grand nombre de « petits » microdépôts (quelques $eV.nm^{-3}$), alors que les dépôts de quelques centaines d'eV sont plus rares (13). La Figure 2 montre la trajectoire d'un rayonnement à faible TEL et d'un autre rayonnement à fort TEL, ainsi que leur implication dans la création des dommages de l'ADN.

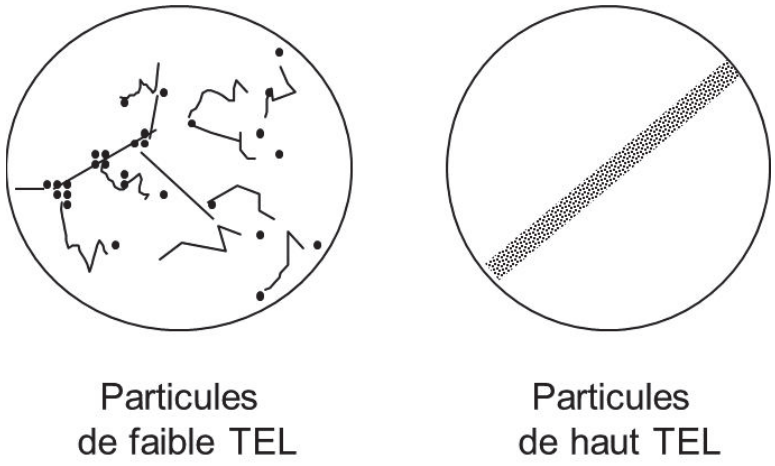


Figure 2 : *Représentation schématique de la trajectoire des radiations de faible (ex : rayons X) et haut TEL (ex : ions lourds) Inspiré de (15).*

1.1.2.4 Structure du trajet d'une particule

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

- la fréquence d'un impact particulaire sur une cible unique est extrêmement faible (10^{-6} Gy^{-1}) : la probabilité de superposition de 2 trajets est donc négligeable, sauf pour des doses supérieures à 10^5 Gy, d'où la nécessité de ne considérer que les trajets uniques pour étudier la formation des dommages de l'ADN.
- le nombre total de segments d'ADN touchés est très élevé (plus de 10000 par Gy), avec une forte prédominance pour les petits dépôts, chacun correspondant à seulement quelques excitations ou ionisations.
- le nombre des dépôts de densités d'énergie supérieures à 100 $eV.nm^{-3}$ correspond au nombre initial de CDB généralement observé (13). Ce sont des événements rares.
- les dépôts les plus importants sont effectués par des radiations de haut TEL mais la diversité des dommages de l'ADN sur un même site (ex : LMDS) est limitée (16).

1.1.3 La radiolyse de l'eau

Les molécules d'eau représentent plus des deux tiers du poids d'un corps humain. La décomposition de l'eau par les rayonnements ionisants est donc à considérer

avec attention pour une meilleure compréhension des phénomènes radioinduits. Comme on l'a dit plus haut, l'ionisation d'une molécule d'eau nécessite environ 13 eV (19-22).

$$H_2O \xrightarrow{\text{Irradiation}} H_2O^{+\bullet} + e^- \quad (1)$$

Elle aboutit rapidement à la formation de deux ions radicaux très instables qui donnent ensuite naissance à des radicaux neutres stables. L'ion $H_2O^{+\circ}$ dont la durée de vie est de 10^{-10}s, subit une réaction ion-molécule bien connue en spectroscopie de masse :

$$H_2O^{\circ+} + H_2O \longrightarrow H_3O^+ + OH^\circ \quad (2)$$

La formation de l'ion (H_3O^+) entraîne une acidification du milieu. Le radical OH°, un oxydant très puissant, possède une grande réactivité chimique sur toutes les molécules avoisinantes (oxygène ou organique). Rappelons que le point «°» signifie qu'un électron n'est pas appareillé sur la molécule. L'électron formé perd progressivement son énergie cinétique initiale dans d'autres ionisations ou dans des excitations. Lorsqu'il est ralenti en deçà du premier potentiel d'excitation de l'eau (≈ 6.6 eV), les électrons primaires et secondaires produisent des électrons de *sous-excitation* jusqu'à ce qu'ils deviennent thermalisés (≈ 0.02 eV). Les électrons thermiques se stabilisent dans le milieu et forment des électrons aqueux et réducteurs très puissants. Ainsi, le résultat des collisions décrites dans la Figure 3, est la présence presque exclusive dans l'eau de e^-_{aq}, OH°, H°, et de H_3O^+ qui proviennent de la radiolyse (19-22).

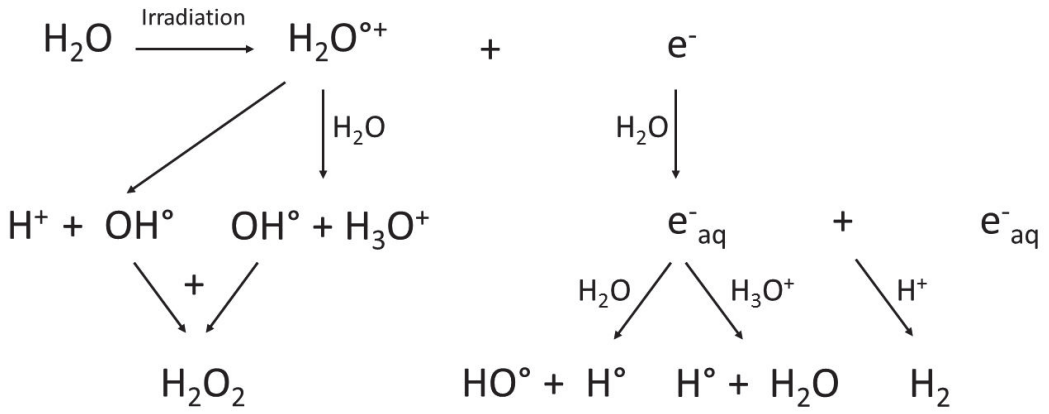


Figure 3 : *Les différentes étapes de la radiolyse de l'eau.*

1.1.4 Les différents dommages radioinduits de l'ADN

1.1.4.1 L'ADN et ses différents degrés de compaction

L'ADN est l'un des constituants essentiels des organismes vivants, représentant plus d'un dixième du poids sec des cellules. Un noyau cellulaire humain moyen d'environ 30 µm de diamètre contient 3 mètres d'ADN.

Toutefois, l'ADN n'est pas organisé de la même façon selon la phase du cycle cellulaire. Ainsi, en mitose (phase M), l'ADN est sous forme chromosomique, le plus haut degré de compaction alors qu'en phase de synthèse (S), l'ADN est sous la forme d'une double hélice telle qu'elle a été décrite par Watson et Crick : celle-ci constitue le degré de compaction le moins élevé. Au cours du cycle cellulaire, la double-hélice s'enroule sur des protéines cylindriques appelés histones pour former le « collier de perles » ou modèle solénoïdal. Puis, l'ADN s'enroule encore sur lui-même pour former un « scoubidou ». Une fois tenu par des protéines d'attachement de la matrice nucléaire (*Matrix attachment region (MAR) proteins*), l'ADN est formé de boucles qui occupent le maximum d'espace dans le noyau.
C'est ce degré de compaction que l'on retrouve dans les cellules quiescentes (en phase G0/G1), c'est-à-dire dans la très grande majorité des cellules de notre corps (à l'exception de l'épithélium intestinal). Il est à d'ailleurs à noter que même pour les enfants, la majorité des cellules sont en phase G0/G1 : c'est seulement lors du développement embryonnaire que cette proportion devient minoritaire au profit des cellules en synthèse ou en mitose. De même, à l'éventuelle exception de certaines métastases, la majorité des tumeurs, même proliférantes, contiennent une majorité

de cellules en G0/G1. Ainsi, le modèle le plus représentatif pour étudier la réponse aux radiations reste bien les cellules quiescentes. Suivant le degré de compaction (et donc la phase du cycle cellulaire), l'endommagement pour une même dose de radiation n'est pas le même et donc la réponse aux radiations dépend de la phase du cycle cellulaire (voir plus loin) (Figure 4).

Dans cette thèse, on privilégiera donc les modèles cellulaires en quiescence.

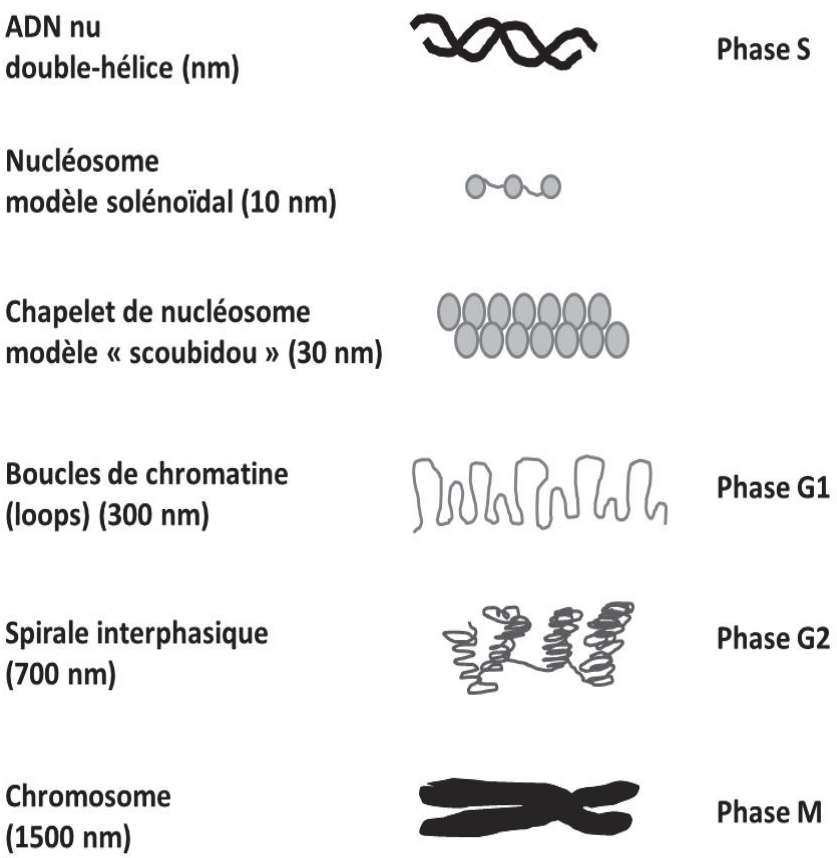


Figure 4 : *Les différents degrés de compaction de l'ADN, les dimensions moyennes et la phase dans du cycle cellulaire dans laquelle on les rencontre le plus souvent (Cours de N. Foray).*

1.1.4.2 Microdépôts d'énergie et sévérité des dommages

Lors de leur développement, les cellules font face à des dommages de l'ADN qu'elles créent elles-mêmes. C'est le cas notamment des cassures de l'ADN en

phase S, des cassures chromosomiques lors de la mitose ainsi que de certaines cassures spécifiques lors de la production des immunoglobulines (recombinaison V(D)J) (27). De plus, certains agents physiques ou chimiques, dits *génotoxiques* (UV, radiations ionisantes, drogues chimiothérapiques) sont à l'origine de plusieurs types de dommages de l'ADN (Figure 7). Les radiations ionisantes produisent de larges spectres de microdépôts d'énergie. Par les excitations et les ionisations qu'ils induisent dans la matière, les microdépôts sont donc la cause de la formation d'une grande diversité de radicaux libres, eux-mêmes à l'origine de la formation d'une grande diversité de lésions de l'ADN (28,29).

Les principaux dommages de l'ADN induits par les radiations ionisantes sont les dommages de bases (DB), les CSB et les CDB. Ces dommages ont des conséquences biologiques plus ou moins importantes selon leur nature (30) :

- les DB regroupent toutes les formes d'altérations telles que l'oxydation, le pontage entre les bases voisines ou la perte d'une base de l'ADN leur réparation est rapide et est généralement exécutée en moins de quelques minutes. Elle s'effectue par le processus d'*excision-resynthèse* (31).
- les CSB représentent environ 1000 dommages par Gy pour une irradiation X ou gamma (32). Leur réparation est généralement exécutée en quelques dizaines de minutes par des processus d'*excision-resynthèse* et de recombinaison (31).
- les CDB sont plus rares (environ 40 par Gy pour une irradiation X ou gamma (32). Les CDB non réparées peuvent conduire, dans certains cas, à la perte définitive de l'information génétique contenue dans la zone altérée (33).

A partir des études évoquées dans le chapitre consacré aux événements physiques, un parallèle a été établi entre la nature biochimique des lésions radioinduites de l'ADN et les microdépôts d'énergie. Les DB (1000 à 10000 par Gy) sont avec les CSB (1000 par Gy), les évènements biochimiques radioinduits les plus fréquents : on estime à 1-10 $eV.nm^{-3}$ l'énergie nécessaire pour créer un DB et 10-100 $eV.nm^{-3}$ pour une CSB. Les pontages ADN-protéines (150 par Gy) et surtout les CDB (40 par Gy par cellule humaine diploïde) sont des évènements beaucoup plus rares (33). Pour créer une seule CDB, il faut plus de 100 $eV.nm^{-3}$. Ainsi, la nature biochimique des lésions de l'ADN dépend directement de la densité d'énergie des microdépôts induits par les radiations (34).

Plus le dépôt d'énergie induisant le dommage de l'ADN est dense, plus la réparation de ce dommage nécessite du temps. Dans les cellules humaines diploïdes normorésistantes, 50% des CDB sont réparées au bout d'une heure (33). La sévérité des dommages (notamment le temps nécessaire pour leur réparation) a été très tôt intuitivement reliée à la densité d'énergie déposée sur l'ADN (16). La première relation mathématique entre la *réparabilité* des dommages de l'ADN et le spectre des microdépôts d'énergie n'a pourtant été proposée qu'en 1998 (Figure 5) (34).

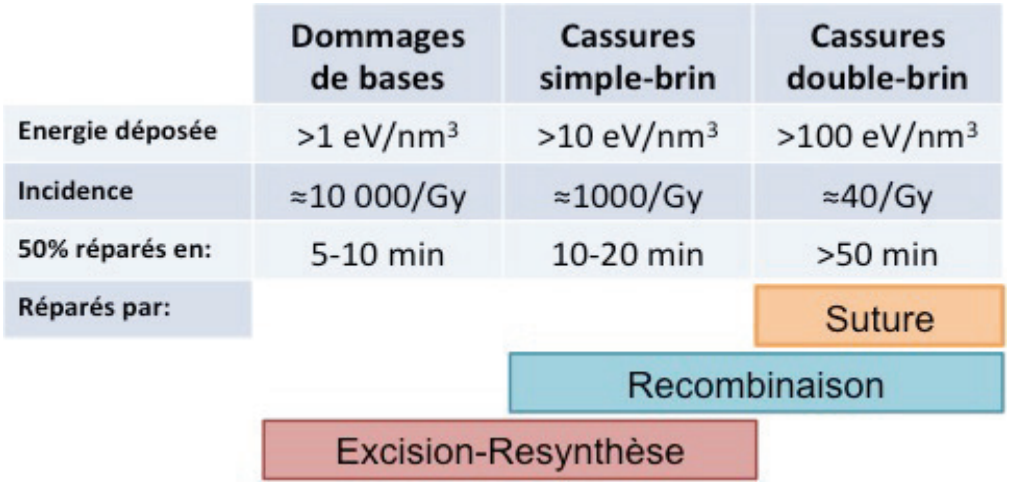


Figure 5 : *Les différents types de dommages radioinduits et leurs caractéristiques physiques, biochimiques et biologiques (cours de N. Foray).*

1.1.4.3 Formation des dommages de l'ADN au cours du temps

Alors que les radiations ionisantes produisent un large spectre de dommages de l'ADN de réparabilité différente, la nature des mécanismes de réparation et le rythme avec lequel ils sont réparés font que de nombreux autres dommages sont créés *après* l'irradiation. En particulier, les DB, excisés après reconnaissance par la voie d'excision-resynthèse, se transforment en CSB : quelques minutes après la fin de l'irradiation, un nombre non négligeable de CSB apparait dans les cellules. Si un trop grand nombre de CSB sont produites et qu'elles soient opposées à moins de 40 paires de bases de distance, une CDB peut être formée (35).

1.2 Prédominance des CDB dans la létalité cellulaire

En dépit du fait que les CDB sont les dommages radioinduits de l'ADN les plus rares, elles sont les événements-clés de la létalité cellulaire. Ce lien privilégié entre CDB non-réparées et mort cellulaire peut être illustré par au moins 4 arguments :

- la plupart des revues générales montrent que seules les CDB évoluent comme la létalité lorsqu'on teste l'influence de paramètres tels que le TEL, l'hypoxie, l'hyperthermie, etc…(36).
- chez les bactéries comme chez les levures, une CDB résiduelle est létale (37). Par exemple, la souche rad 54-3 qui répare les CDB à 23°C est radiorésistante quand elle est irradiée à cette température. A l'inverse, incapable de réparer les CDB à 36°C, cette souche devient alors 100 fois plus radiosensible (33).
- dans la période 1980-2000, une déficience de réparation des CDB a été observée pour plusieurs lignées cellulaires humaines. Ce fut le cas des lignées $ATM^{-/-}$ (38,39), de la lignée fibroblastique 180BR qui provient d'un patient leucémique radiosensible muté pour $LIG4^{-/-}$ (40), des lignées tumorales DNA-PK-/- M059J (41), $BRCA1^{-/-}$ HCC1937 et $BRCA2^{-/-}$ Capan-1 (42): les taux de CDB résiduelles à 24 h sont de l'ordre de 40% alors qu'ils ne sont plus mesurables chez les témoins. Ces quatre lignées déficientes pour la réparation des CDB sont hyper-radiosensibles (survie à 2 Gy de l'ordre de 1 à 5%). Enfin, en 2008, une étude systématique de 8 syndromes humains radiosensibles majeurs a montré qu'il existe une relation entre le taux de CDB non réparées et la radiosensibilité (43) : les syndromes génétiques liés à un défaut de réparation des CDB étant systématiquement associés à une radiosensibilité (44).
- une CDB non réparée conduit à une cassure chromosomique puis à un micronoyau si celle-ci n'est pas réparable. Or, il existe une relation quantitative entre les cassures chromosomiques et micronoyaux et la létalité cellulaire (45).

Ainsi, dans cette thèse, nous avons choisi de nous focaliser plutôt sur les CDB, leur incidence, leur réparation, afin de dresser un tableau réaliste des événements radioinduits létaux.

1.2.1 Généralité sur les techniques de mesure des CDB

Comme pour tous les dommages radioinduits de l'ADN, la réponse aux radiations obéit à 3 phases pour les CDB (46):

- *la phase d'induction* des CDB: l'induction des CDB par les radiations est considérée comme spontanée à l'échelle des temps biologiques. Leur nombre est limité par la taille du génome (cible=noyau) et par l'énergie nécessaire pour induire au moins une CDB. Le nombre de CDB induites par les radiations ne dépend pas de la radiosensibilité individuelle.
- *la phase de reconnaissance* des CDB: pendant cette phase, le nombre de CDB reconnues par les systèmes de réparation augmente jusqu'à atteindre une valeur maximale à un rythme, une valeur et un temps post-irradiation qui dépendent de plusieurs paramètres tels que la dose et le facteur individuel.
- *la phase de réparation* des CDB: pendant cette phase, le nombre de CDB diminue jusqu'à une valeur résiduelle, à un rythme qui dépend de plusieurs paramètres tels que la dose et le facteur individuel.

Suivant les techniques utilisées, ces 3 phases peuvent être caractérisées séparément ou confondues. Plusieurs méthodes ont été développées depuis les années 70 dans le but de quantifier le nombre de CDB. Jusque dans les années 2000, les CDB étant « des trous dans l'ADN », les techniques eurent toutes en commun le fait de ne jamais mesurer directement les CDB, mais plutôt des fragments d'ADN à travers leurs propriétés mécaniques et électrophorétiques ou par le degré de relaxation de la chromatine que ces cassures peuvent produire. Le calibrage (c'est-à-dire la déduction du nombre réel de CDB à partir des données expérimentales) se faisait généralement grâce à de l'ADN marqué radioactivement avec de l'^{125}I. En effet, chacune des cascades Auger produites donne une énergie suffisante pour former une seule CDB (37,47,48). Toutefois, le point faible de la plupart de ces méthodes était de nécessiter des doses importantes (plusieurs dizaines de Gy) pour obtenir un grand nombre de fragments pour pouvoir mesurer un signal, alors qu'il suffit de quelques Gy pour induire la létalité cellulaire (49). La connaissance du lien entre la dose et l'effet devint alors cruciale.

1.2.1.1 Immunofluorescence

C'est la technique la plus utilisée actuellement et celle qui a été privilégiée dans cette thèse. Elle est basée sur l'hybridation de sondes fluorescentes avec des anticorps dirigés contre des protéines d'intérêt. C'est notamment le cas pour les protéines impliquées dans la reconnaissance et la réparation des CDB, comme pATM et γH2AX qui se relocalisent de façon ponctuelle en formant des foci lumineux sur les sites de ces cassures (Figure 6) (55). Alors que la plupart des foci nucléaires sont quantifiables pour des doses de l'ordre du Gy, la limite de cette technique se trouve dans 2 difficultés principale comme :

- la difficulté du comptage des foci pour des doses élevées mais aussi aux artéfacts de la fluorescence. De plus, des artéfacts spécifiques ont été observés dans le cas de la co-immunofluorescence : quand deux couleurs sont utilisées, on observe souvent une superposition des foci qui suggère une co-localisation des protéines. Une telle superposition est généralement causée par les chevauchements des spectres d'émissions et d'excitation des marqueurs de protéines utilisés. Cet artéfact de co-immunofluorescence appelé en anglais *bleed-through* est à l'origine de nombreuses fausses interprétations (56).
- La connaissance du rôle biologique réel des protéines qui forment des foci.

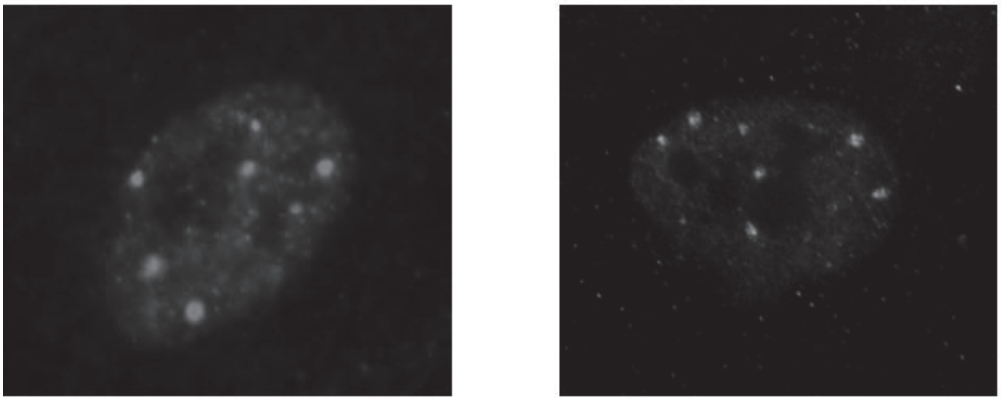


Figure 6 : *Exemple d'immunofluorescence avec marquage avec un anticorps anti-γH2AX. Chaque foci reflète un site de CDB (données du laboratoire).*

On privilégiera dans cette thèse l'usage de l'immunofluorescence avec 1 seul biomarqueur tout en approfondissant les connaissances sur le rôle de chaque biomarqueur utilisé.

1.2.2 Induction des CDB

Le nombre de CDB physiquement induites par les rayons X (ou gamma) immédiatement après l'irradiation (donc sans effet de réparation), est linéairement dépendant de la dose avec une valeur d'environ 40 (37 ± 5) CDB par Gy par fibroblaste diploïde humain quiescent et non-transformé (39,43). Ce taux d'induction de CDB dépend de la taille du noyau, de la condensation de la chromatine, du TEL des radiations utilisés et des conditions biochimiques dans lesquelles a été faite la mesure (59). Par exemple, le nombre de CDB par Gy est réduit à quelques CDB pour 100 Gy dans les levures et les bactéries, 20-25 CDB par Gy pour des lymphocytes humains, ce qui correspond à une loi globalement proportionnelle à la taille du noyau. On évoque également le taux de CDB induites d'environ 2-6 CDB par 1000 mégapaires de base (Mpb) (33,52). De même, on compte environ 80 CDB par Gy par cellule en phase S, 40 CDB par Gy en G0/G1 et 20 CDB par Gy en mitose, suivant ainsi le degré de compaction de la chromatine. D'ailleurs, une telle différence n'est pas sans conséquence puisque la réponse finale aux radiations dépend de la phase du cycle cellulaire. Ainsi, alors que l'on pourrait penser qu'avec 2 fois plus de CDB induites, les cellules en phase S soient plus radiosensibles que les cellules en G0/G1, il apparaît au contraire que les cellules en phase S sont les plus radiorésistantes. En fait, en phase S, les cassures naturelles de l'ADN des fourches de réplication activent certaines voies de réparation qui permettent une reconnaissance et une réparation plus rapide qu'en G0/G1, même si le nombre de CDB induites par Gy y est plus élevé. Cet exemple représentatif montre que ce n'est pas le nombre de CDB induites qui est lié à la radiosensibilité mais bien le nombre de CDB non-réparées.

1.2.3 Reconnaissance et signalisation des CDB

L'oxydation qui créé les dommages de l'ADN induits par les radiations ionisantes déclenche une cascade de phosphorylations liées de façon causale entre elles et ordonnées temporellement. Ces phosphorylations jouent un rôle primordial dans la reconnaissance des dommages, leur réparation, le retard du cycle, le déclenchement de la mort cellulaire, ainsi que dans le maintien de la stabilité génomique (60).

Si un substrat en amont n'est pas phosphorylé, le substrat qui aurait dû être phosphorylé en aval immédiatement après lui ne le sera pas et cette absence de phosphorylation aura une conséquence fonctionnelle précise. Ainsi, en mutant un des substrats, ou en empêchant sa phosphorylation, on peut vérifier sa place dans la hiérarchie fonctionnelle des phosphorylations radioinduites (60) (Figure 7).

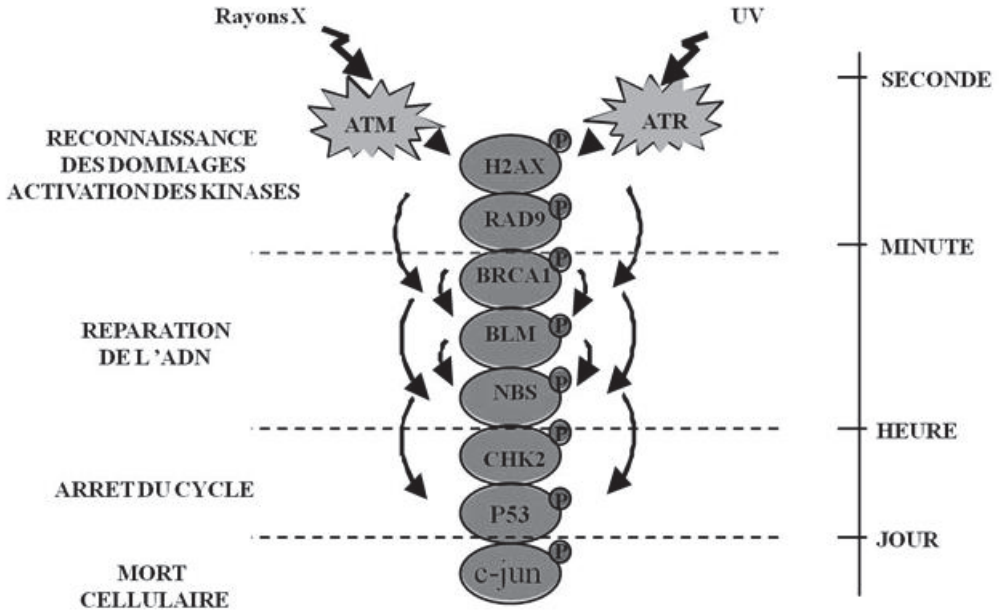


Figure 7 : *Hiérarchie des évènements après un stress génotoxique dépendant d'ATM ou d'ATR (Cours de N. Foray).*

Deux kinases, ATM et ATR, jouent un rôle essentiel dans la reconnaissance et dans les phosphorylations radioinduites (61,62). Ces kinases sont activées différemment : ATM réagit au stress oxydatif qui provoque l'induction des CDB, alors qu'ATR s'active en réponse à d'autres formes de dommages de l'ADN tels que ceux observés dans les fourches de réplications bloquées (62,63).

Lors de l'activation des sérine-thréonine kinases (comme DNA-PKcs, ATM ou ATR (61,64)), le résidu sérine 139 (motif SQE) de l'histone H2AX est phosphorylé (65-67). Cette phosphorylation fait partie des événements les plus précoces qui suivent la formation physique des CDB. Ainsi, l'utilisation d'un anticorps spécifique de la forme phosphorylée de l'histone H2AX (γH2AX), montre la présence de nombreux *foci* dans le noyau des cellules irradiées. Il existe une étroite corrélation entre le

nombre de *foci* γH2AX et le nombre de CDB induites après irradiation (55,68). Une corrélation directe a été observée entre le nombre de *foci* et le nombre de CDB produites par la désintégration de ^{125}I incorporé dans l'ADN de cellules, démontrant que chaque *focus* représente une cassure et que chaque CDB forme un *focus* (69). Toutefois, cette règle a pu être contrastée par l'observation de petits et gros foci qui caractérisent souvent des cellules issues syndromes associés à une forte instabilité génomique et un grand nombre de CSB spontanées (Granzotto *et al.* en préparation)

De plus il est important de noter que la phosphorylation de H2AX est étroitement liée au mode de réparation des CDB, c'est l'objet du chapitre suivant.

1.2.4 Réparation des CDB

1.2.4.1 « Le modèle de la chaussette »

Pour les mammifères, il existe 2 modes de réparation des CDB :

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

Comme on l'a vu plus haut, les cellules de mammifères sont en grande majorité dans la phase G0/G1. Ainsi, la prédominance de la réparation par suture, principalement active en G0/G1, en fait une spécificité des mammifères. Par ailleurs, cette dualité de voies de réparations peut être illustrée par « le modèle dit de la chaussette » (N. Foray, cours de radiobiologie) :« *comme le raccommodage des chaussettes, 2 techniques sont possibles: la suture, qui consiste à rapprocher les brins cassés et les liguer ; et le rapiéçage (ou recombinaison) qui consiste à insérer un brin coupé dans le trou formé par la première cassure. Ce mode de réparation produit donc 2 autres cassures. C'est donc un mode de réparation qui casse* ». Le modèle de la chaussette permet de mieux comprendre les conséquences cliniques de non-réparation ou de mauvaise réparation suivant le mode de réparation choisi (Figure 8).

1.2.4.2 La réparation par recombinaison

La réparation par recombinaison consiste à remplacer la séquence endommagée par une séquence d'ADN prise « au hasard ». En fait, dans le cas de la mitose, au moment où des régions chromosomiques sont bien définies, ou dans le cas des petits génomes, cette séquence peut-être identique et homologue (RH, *recombinaison homologue*) (70). Dans le cas inverse (non-homologue), on parle alors de recombinaison illégitime ou *non-homologue* (71). La reconnaissance des CDB réparées par recombinaison est assurée par les anneaux heptamériques Rad52 qui coulissent le long de l'ADN. Une fois l'anneau proche de la cassure, la protéine Rad51 est recrutée et forme un nucléofilament qui va rapprocher les brins homologues (ou non-homologues) près du site de réparation. La formation de ce nucléofilament met en jeu une multitude de protéines comme les protéines RPA (*Replication Protein A*), XRCC2 et XRCC3 ainsi que les protéines BRCA1 et BRCA2 (Figure 13). Cependant, les étapes exactes suivant la reconnaissance des CDB par Rad52-Rad51 sont encore méconnues (72).

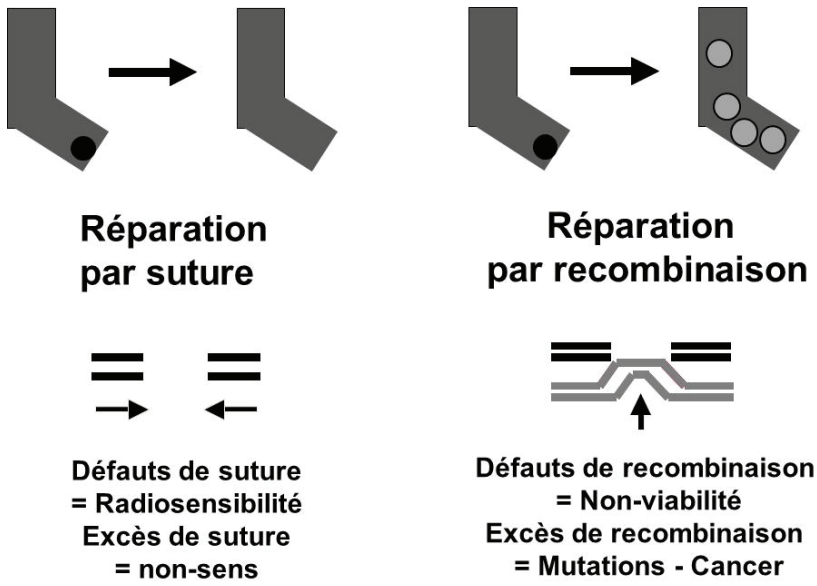


Figure 8 : *Représentation du « modèle de la chaussette ». Une CDB est soit suturée (sans échange de brins), soit « rapiécée » (recombinée, avec échange de brins). Les conséquences cliniques des défauts ou des manques de contrôle des 2 modes de réparation sont précisées. Le rapiéçage-recombinaison s'accompagne souvent de l'induction d'autres cassures elles-mêmes subissant la recombinnaison (phénomène d'hyper-recombinaison) (Cours de N. Foray).*

Alors que l'absence de toute recombinaison homologue est létale chez les mammifères (non-viabilité), il a été montré qu'un manque de contrôle de la recombinaison pouvait contribuer à une forte instabilité génétique : c'est l'hyper-recombinaison (73,74). Par ailleurs, la surexpression de Rad51 a été observée dans de nombreuses cellules tumorales induisant un fort taux de recombinaison. Les aberrations chromosomiques typiques d'un manque de contrôle de la recombinaison sont les translocations, souvent associées à différents types de cancer (62).

1.2.4.3 La réparation par suture

Pour les cellules de mammifères, la réparation par suture (non-homologous end-joining (NHEJ)) est le principal système de réparation des CDB. La protéine Ku80 s'associe à la protéine Ku70 (75), et cet hétérodimère coulisse le long de l'ADN. Au niveau de la cassure, il recrute la protéine DNA-PKcs. Ces trois protéines forment le complexe DNA-PK, qui a une fonction de kinase essentielle dans le processus de réparation NHEJ : cette kinase phosphoryle certaines protéines *histones*. Les protéines de réparation (Ligase 4 et XRCC4) sont ensuite recrutées pour liguer les 2 extrémités de l'ADN (Figure 9). Les erreurs chromosomiques typiques d'un défaut de suture NHEJ sont généralement des délétions qui peuvent être associées à une forte radiosensibilité et une immunodéficience sévère (76). Ce modèle très populaire oublie de façon surprenante la protéine ATM alors que celle-ci est requise dès les premières minutes de l'irradiation. D'ailleurs, la mutation de DNA-PK n'entraîne un changement de rythme de réparation qu'à partir de la première heure alors que la mutation d'ATM concerne tous les temps de la cinétique de réparation (46,59).

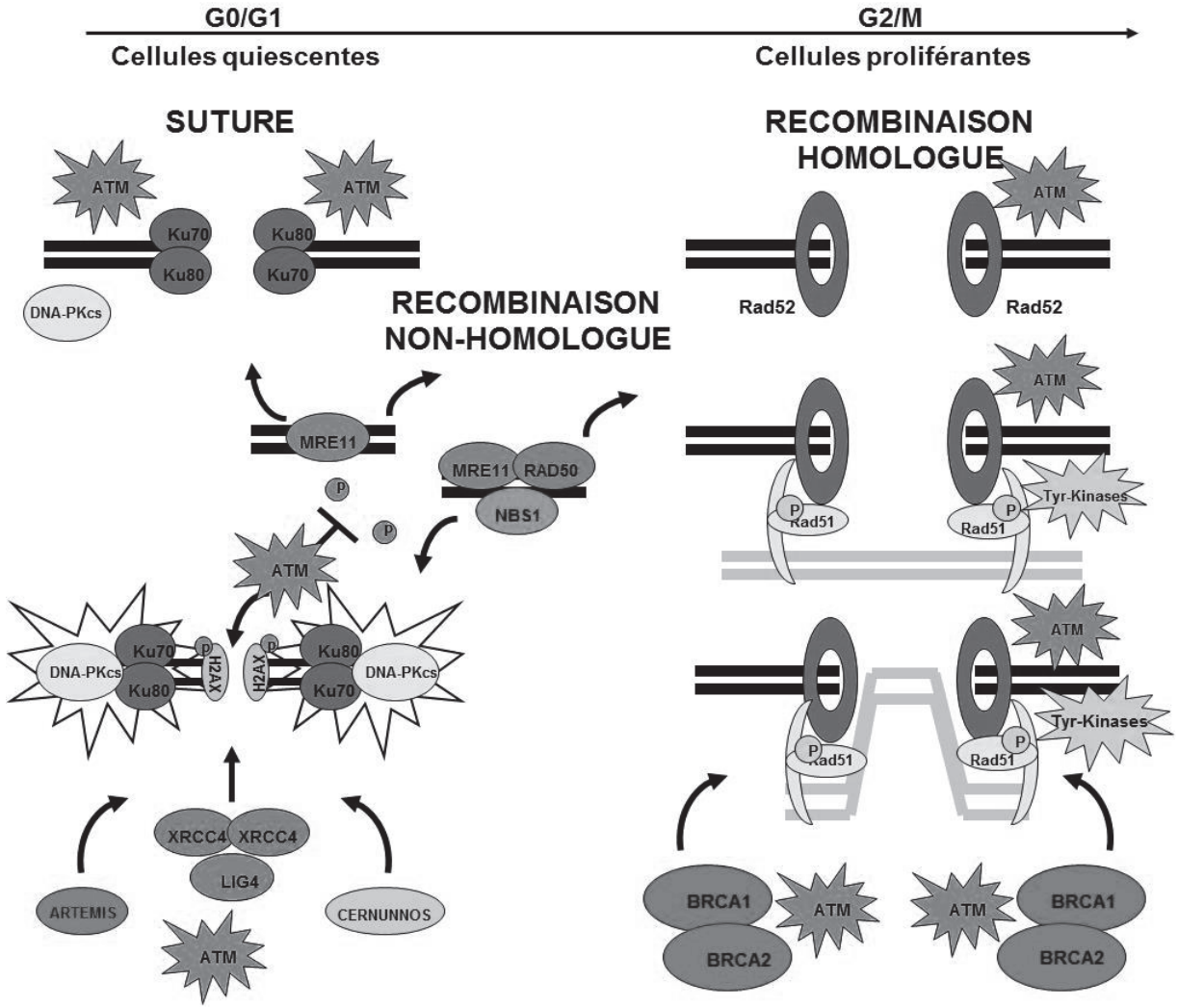


Figure 9 : *Principales voies de réparation des CDB (Cours de N. Foray)*

1.2.4.4 Le paradigme actuel de la réparation des CDB

Une fois ces principes généraux énoncés, il faut évoquer les aspects historiques liés à ces 2 modes de réparation. En effet, prône aujourd'hui une vision duale qui oppose la recombinaison homologue de la suture non-homologue. Pour expliquer ce paradigme, un rappel sémantique s'impose. La recombinaison est le premier mode de réparation qui a été mis en évidence, très probablement parce que les données sur les bactéries et les levures étaient plus abondantes que celles issues des cellules humaines et que les micro-organismes se prêtaient mieux aux manipulations génétiques. Pour ces micro-organismes caractérisés par un petit génome, la recombinaison est plutôt *homologue* et possède une forte probabilité d'être fidèle car les séquences échangées seront moins variées (59,77).

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

Par ailleurs, la suture non-homologue tout comme la recombinaison homologue ne pouvait expliquer la propagation des erreurs et la transformation cellulaire liée à une mauvaise réparation. En effet, ce modèle excluait l'existence d'un troisième mode de réparation, une recombinaison qui s'effectuerait au hasard, ou du moins avec un échange de brins d'une grande variété, tout-à-fait possible en G0/G1 par l'action de nucléases. La théorie du transit d'ATM développé par le laboratoire a intégré cette remarque importante (59,77).

1.2.5 Rôle de ATM dans la réponse aux dommages

1.2.5.1 Généralités sur ATM

Le rôle de ATM a été mis en évidence à partir de 1995, année de la découverte de la mutation du gène ATM causant l'ataxie télangiectasie (AT), syndrome associé à une

hyper-radiosensibilité et une forte prédisposition au cancer (94). ATM est présente sous forme de dimères dont les monomères se phosphorylent mutuellement. On parle d'*autophosphorylation* alors que ce terme est impropre et devrait se substituer à *trans-phosphorylation*. L'induction des CDB a été relié à la dissociation des dimères d'ATM sous forme de monomères (95). C'est également ainsi que la protéine ATM serait activée. En particulier, ATM phosphoryle la protéine NBS (Nijmegen Breakage Syndrome) qui fait partie du complexe MNR (Mre11/NBS/Rad50) présent au niveau des sites de dommages. La phosphorylation de NBS stabiliserait le complexe MNR et permettrait le recrutement de molécules ATM supplémentaires au niveau du dommage (96). Le complexe MNR augmenterait ainsi l'activité kinase d'ATM « par feed-back » (97). ATM ainsi suractivée interviendrait au niveau des points de contrôle du cycle cellulaire, en phosphorylant un grand nombre de substrats, comme les protéines de checkpoint Chk1 et/ou Chk2 (Checkpoint kinase 1 ou 2) et la protéine p53. De nombreux modèles d'action d'ATM comme celui-ci ont été établis. Toutefois, ceux-ci sont généralement basés sur des cellules transformées, sans réelle recherche d'un lien quantitatif avec la dose de radiation en particulier ou de stress génotoxique en général. Ils ont également été établis à partir d'immunoblots effectués sur des extraits protéiques « totaux » c'est-à-dire mêlant cytoplasme et noyau et dans des conditions de stress souvent irréalistes.

1.2.5.2 Localisation d'ATM dans les cellules humaines

En 2015, Il n'existait un consensus ou plutôt un paradigme concernant la localisation de la protéine ATM : celui de la considérer comme nucléaire, simplement parce que le rôle de cette kinase est majeur dans la réparation des CDB de l'ADN et plus généralement dans la réponse au stress génotoxique (98,99). Ce paradigme faisait écho à celui qui considérait que la radiosensibilité trouvait ses causes dans les défauts de réparation de l'ADN. Pourtant, aucune publication sur des extraits cytoplasmiques ou des observations par immunofluorescence sur le cytoplasme ne venait consolider ce paradigme. La plupart des chercheurs considéraient la localisation cytoplasmique de pATM en immunofluorescence comme non-spécifique ou artéfactuelle. Quelques études avaient pourtant montré qu'ATM se trouvait majoritairement dans le cytoplasme de certaines cellules, notamment dans les cellules de cervelet humain et des souris Purkinje (100,101). Mais ces travaux étaient peu cités. De plus, chez les patients souffrant d'AT, certains traits sont liés à

des fonctions cytoplasmiques: le niveau élevé de facteurs de croissance (102), l'insulino-résistance (103), la modification du cytosquelette (104), le déficit de l'immunité humorale (105), les modifications de la régulation des canaux K^+ (106). Là encore, jamais ces observations cliniques ne venaient troubler l'hypothèse « nucléaire » d'ATM. D'ailleurs, si des formes d'ATM sont cytoplasmiques, il fallait aborder la possibilité que celles-ci puissent passer dans le noyau, en réponse ou non à un stress. Ainsi, certaines études se focalisèrent sur un mode de transport actif impliquant des séquences de localisations nucléaires (site NLS pour Nuclear Localization Sites) portés par ATM, et qui seraient responsables du transit cyto-nucléaire de la kinase (107). Là encore, il n'existait aucun consensus sur un éventuel passage de ATM du cytoplasme au noyau et encore moins sur son mode d'action : en fait, les NLS s'avérèrent de piètres indices pour les radiobiologistes car ils restent intacts après irradiation, suggérant que la notion de transit cyto-nucléaire radioinduit doit impliquer d'autres processus actifs. Toutefois, au laboratoire, nous pouvions constater par immunofluorence la localisation cytoplasmique d'ATM (Figure 10)

Par contre, il fallait alors expliquer le passage du cytoplasme au noyau. C'était l'occasion de revoir brièvement les principes actuels de la diffusion d'une protéine à travers une membrane dans ces expressions les plus générales. C'est l'objet du chapitre suivant.

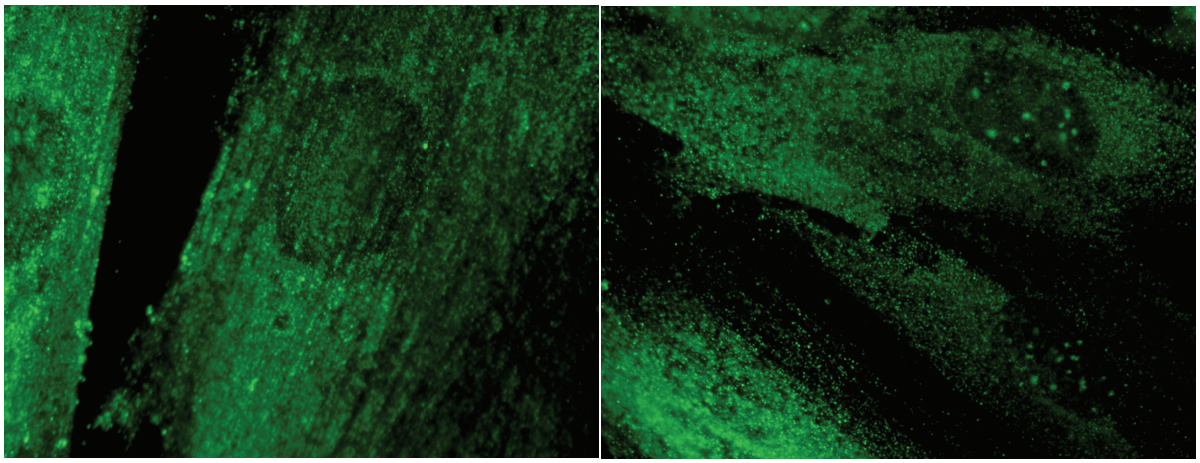


Figure 10 : *Exemples d'images d'immunofluorescence avec un anticorps anti-pATM sur des fibroblastes cutanés de différentes origines. On observe notamment une partie importante de marquage cytoplasmique (Données du laboratoire).*

1.2.6 Diffusion d'une protéine à travers une la membrane nucléaire

L'enveloppe du noyau des cellules eucaryotes est constituée d'une bi-couche lipidique dont la rigidité est assurée par les lamines. Bien que continues, les membranes internes et externes sont de compositions différentes. La membrane externe de la bicouche est en continuité avec la lumière du réticulum endoplasmique (RE) et des pores assurent le transport bi-directionnel des protéines. Le noyau possède plusieurs fonctions essentielles, il stocke l'information génétique et est le lieu de sa réplication et de sa transcription. Le transport cyto-nucléaire est ainsi fondamental : 1) les protéines impliquées dans les fonctions nucléaires telles les histones, les ADN et ARN polymérases, les facteurs de transcription, les protéines ribosomales et les protéines de réparation des l'ADN sont synthétisées dans le cytoplasme et doivent être importées dans le noyau 2) les ARNt et ARNm sont synthétisés dans le noyau et doivent être exportés dans le cytosol. 3) l'enveloppe nucléaire est détruite lors de la division cellulaire mélangeant les composés nucléaires et cytoplasmiques qui doivent être redistribués une fois cette étape effectuée.

La taille des molécules à transporter détermine le type de transport impliqué. Pour les petites molécules (ions, métabolites, proteines inférieures a 40kDa), le passage se fait de manière passive à travers le pore nucléaire, complexe d'environ 120MDa, composé de plus de 1000 nucléoporines (proteines) . Les molécules les plus grosses devront faire appel à des importines ou exportines de la famille des karyophérines pour franchir la membrane nucléaire.

1.2.6.1 Principes physiques

1.2.6.1.1 Loi de diffusion de Fick

Les premiers pas vers la compréhension du comportement des molécules dans un liquide ont été réalisés par le développement de la théorie du mouvement brownien initiée le botaniste Robert Brown en 1827. Cette théorie est à la base du modèle proposé par Adolf Fick en 1855 (108) puis démontrée par Albert Einstein en 1905 (109).

Les travaux de Fick ont permis de développer la théorie des transports membranaires. La diffusion membranaire est le passage d'une molécule ou d'un ion

d'un milieu à un autre en traversant une membrane. Il existe plusieurs modes de diffusions, passif ou actif. Notons cependant que la plupart des modèles qui vont suivre ont été validés par des protéines de petite taille : *seules les lois générales de Fick restent valables quel que soit le poids de la protéine considérée.*

1.2.6.1.2 Transport passif

C'est un mode de transport qui se fait en fonction des gradients de concentration de la molécule considérée, sans consommation d'énergie. Il existe 2 types de transport passifs :

Diffusion simple : C'est un phénomène purement physico-chimique qui se fait dans le sens du gradient de concentration de la molécule à transporter, à travers la membrane (Figure 17). Les caractéristiques de ce transport sont :

- une absence de saturation, la vitesse de diffusion dépend de la différence de concentration mais aussi de la taille de la protéine et de la température ;
- le transport n'est pas régulé ;
- ce mode transport est plus lent que les autres : les molécules doivent se dissoudre dans la double couche de phospholipides avant de passer de l'autre côté.

Diffusion facilitée à travers les pores nucléaires: C'est un mode de transport passif, mais contrairement à la diffusion simple, il est spécifique et régulé, et fait intervenir des protéines transmembranaires de transport : les protéines de canal, et les transporteurs.

- Transport à travers les protéines de canal, ou canaux ioniques : c'est un mode de transport extrêmement rapide, régulé et spécifique : les canaux ne laissent passer que quelques molécules en bloquant l'accès aux autres, et tout en ayant la capacité de se fermer. Le diamètre du canal joue un rôle important dans le transport qu'il peut assurer. Ce mode transport concerne les protéines inférieures à 50 MDa.
- Transport à travers les transporteurs : ce transport est semblable aux canaux ioniques, sauf qu'il est généralement moins rapide. Ce sont des protéines transmembranaires, les perméases, qui vont lier d'une manière spécifique la molécule à transporter qui va changer de conformation et qui va libérer la molécule à

transporter de l'autre côté de la membrane. Cette diffusion passive lente peut transporter des molécules jusqu'à 50 MDa.

Les protéines supérieures à 50 MDa sont transportées activement.

1.2.6.2 Principes biologiques

À travers la membrane particulière qu'est la membrane nucléaire, le transport cyto-nucléaire, et son inverse, le transport nucléo-cytoplasmique s'effectuent par le pore nucléaire, assurant à la fois le passage passif et le passage actif.

1.2.8.2.1 Le pore nucléaire

Le pore nucléaire est une structure tridimensionnelle, construit un autour d'un canal central de 9 nm, présentant une symétrie d'ordre 8 (octogonale) liée à l'agencement régulier de 8 complexes protéiques en forme d'anneau à 8 rayons et de 120nm de diamètre.

L'armature du pore est constituée de ces complexes protéiques formant deux anneaux, ancrés sur les faces nucléoplasmique et cytosolique de l'enveloppe nucléaire. Les deux anneaux sont reliés l'un à l'autre, au travers de l'épaisseur du pore, par 8 bras radiaires faisant saillie au centre de l'orifice du pore.

Chacun des deux anneaux sont composés d'au moins 64 sous unités, cette structure est prolongée par une structure en en cage (Fish-trap) orientée vers le noyau. Elle est formée par des filaments radiaires perpendiculaires à la surface formant un autre anneau distal de diamètre inférieur et qui est en relation avec le réseau sous-membranaire.

Le modèle du double iris ou du double diaphragme octogonal rend compte du fonctionnement du pore nucléaire : Lorsque le diaphragme est fermé, il persiste une ouverture de 9nm de diamètre permettant la **diffusion passive** (nucléotides, ions...). **Le transport actif** (pour les molécules plus grandes) requiert l'ouverture du double diaphragme et nécessite de l'énergie. Après reconnaissance d'un signal de transport, le premier diaphragme s'ouvre et la protéine s'engage alors à travers le pore. Le second diaphragme s'ouvre alors tandis que se ferme le premier. Ce transport s'effectue avec consommation d'energie.

Les protéines qui sont accumulées dans le noyau possèdent une séquence signal dans leur chaîne primaire d'acides aminés permettant l'import vers le noyau (ou NLS pour nuclear Localization Signal) ou l'export vers le cytoplasme NES (pour Nuclear Export Signal). Ce transport des protéines du cytoplasme vers le noyau (et inversement) nécessite un apport d'énergie fourni par l'hydrolyse du GTP par la GTPase Ran. En effet, l'exportine et l'importine se fixant respectivement aux NLS et NES des proteines à faire transiter permettent le passage à travers le pore. Dans le cytoplasme l'importine se lie à la protéine et passe le pore, une fois dans le noyau, la liaison Ran-GTP à l'importine dissocie le complexe. À l'inverse dans le noyau, l'exportine, Ran-GTP et la protéine passent le pore ensemble et l'hydrolyse du GTP dans le cytoplasme sépare le complexe.

Certaines protéines telles que les récepteurs de certaines hormones stéroïdes et la protéine nucléolaire (nucléoline) sont transportées en permanence entre le cytosol et le noyau. Ces protéines posséderaient deux signaux différents, le NLS et un signal de rétention nucléaire. Elles ne posséderaient pas de signal d'exportation vers le cytosol.

1.3 La survie cellulaire

1.3.1 La mort radiobiologique

A la fin du XIXème siècle, la plupart des types de mort cellulaire était connu, grâce aux pionniers, qui patiemment décrivirent avec force détails ce qu'ils observaient au microscope (125,126). Ainsi, on ne parlait pas de « la » mort cellulaire mais bien « des » morts cellulaires. Avec l'usage des rayons X, s'est posée la question des spécificités de chaque type de morts et de leur contribution relative à la mort globale en fonction de la dose de radiation. Comme on le verra plus loin, il existait peu de points communs entre ces morts à l'exception d'une notion fondamentale : la prolifération, ou plutôt la clonogénicité, c'est-à-dire la capacité à donner des cellules-filles. La mort radiobiologique d'une cellule fut donc définie *par convention* par la *perte définitive de sa capacité de division.* Ainsi, une cellule rendue stérile par l'irradiation est considérée comme morte. En particulier, on oublie souvent qu'une cellule « condamnée à mort » peut, avant sa disparition physique, continuer à *métaboliser* et notamment à *réparer* les dommages induits dans l'ADN (59). Par

exemple, après des doses 4 à 20 fois supérieures à la dose létale moyenne, les cellules sont mortes (stérilisées) mais réparent (58). En effet, la notion de mort est définie *à l'échelle de la cellule*, alors que la réparation, qui peut s'effectuer dans un tube à essai contenant, eau, sels, protéines et ADN, est *une notion moléculaire* (la mort « moléculaire » refléterait ici la destruction des protéines et de l'ADN).

- cette définition convient bien à la radiothérapie anti-cancéreuse qui tente de stopper définitivement la prolifération de la tumeur, sans pour autant exiger une disparition physique immédiate. En effet, une tumeur, contrainte dans son volume pendant un certain temps, peut montrer des signes de destruction et disparaitre. A l'inverse, des cellules mortes peuvent poursuivre quelques cycles cellulaires et stopper ensuite définitivement leur croissance : c'est le cas des *clones abortifs* qui montrent l'aspect de petites colonies. Il a fallu définir la notion de « colonie ». Par convention, on considère qu'une colonie est le résultat d'au moins 50 cellules filles, c'est-à-dire qu'elle a été produite par au moins 5 doublements ($2^5 = 32$; $2^6 = 64$) (20).

1.3.2 La technique de référence en radiobiologie

La définition de la mort cellulaire est à la base du test de référence de la radiobiologie : la *méthode des colonies* ou *test clonogénique*. Ce test consiste à irradier une nombre connu de cellules puis à en quantifier les colonies issues des cellules filles (en respectant la définition des colonies expliquée plus haut) (127). Plus le nombre de colonies est grand, plus la cellule est radiorésistante. Les courbes de survie sont généralement représentées dans un graphe semi-logarithmique et illustre la relation dose (abscisse) – survie (ordonnée logarithmique) (Figure 11).

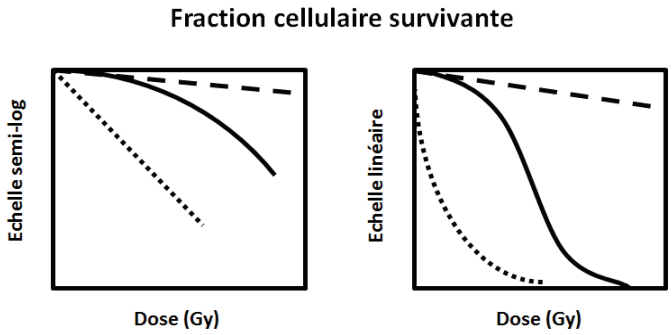


Figure 11 : *Représentation schématique de la survie clonogénique en fonction de la dose de radiation en utilisant l'échelle semi-logarithmique ou linéaire. La courbe en pointillés représente une lignée radiosensible, la courbe en traits représente une lignée radiorésistante.*

En 1956, Puck et Marcus proposèrent d'utiliser le test *in vitro* des colonies pour quantifier la radiosensibilité. Les premiers tests clonogéniques *in vivo* furent proposés par H.B. Hewitt et C.W. Wilson (128). Comme on le verra dans les prochains chapitres, chaque lignée cellulaire est caractérisée par une seule réponse propre ou *radiosensibilité intrinsèque* (129).

La méthode des colonies, bien que contraignante, chronophage, et nécessitant un savoir-faire en culture cellulaire, est restée à ce jour la méthode de référence de mesure de la radiosensibilité cellulaire. Pourtant, l'inconvénient d'attendre 7 à 17 jours que les colonies se forment a incité certains scientifiques à développer d'autres tests : les tests d'exclusion, de non-exclusion ou tests dits de viabilité. Certaines drogues, comme le MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium), possèdent la propriété d'incorporer le cytoplasme ou le noyau si la cellule métabolise ou ne métabolise plus au sens électrique (mitochondrial) du terme (130). Ainsi, dans le cadre d'un test d'exclusion, si les cellules sont colorées, elles sont considérées comme « non viables donc mortes ». L'avantage de cette technique est que la coloration est immédiate. Cependant il peut y avoir confusion entre la notion de non-viabilité et celle de mort cellulaire. En effet, comme on le verra plus loin avec la sénescence, une cellule irréversiblement arrêtée en G0/G1 est considérée comme morte mais les tests de non-viabilité resteront négatifs dans ce cas : les tests de non-viabilité peuvent donc sous-estimer la mort radiobiologique.

Dans ce travail nous appliquerons donc la technique des colonies plutôt que les tests d'exclusion.

1.3.3 Les trois types majeurs de mort de cellulaire

La perte de capacité de division est la conséquence de plusieurs types de réponses aux radiations ionisantes. En effet, trois types de morts radioinduites *définies fonctionnellement* ont été répertoriés: la mort mitotique, la mort par sénescence et la mort apoptotique. On peut ajouter à cette liste un quatrième type de mort, la mort par *intercinèse*, qui décrit la disparition physique quasi-immédiate de la cellule après des doses de radiations de plusieurs milliers de Gy, doses à partir desquelles l'effet thermique des radiations devient dominant. D'autres termes de mort cellulaire (comme par exemple l'*oncose* ou la *pyknose*) ont été définis après observation au

microscope et correspondent plutôt à des états particuliers des morts précédentes, notamment au niveau des tissus plutôt qu'au niveau de cellules individuelles. L'autophagie (131) ainsi que l'ontose (132) sont également citées mais la fréquence de ces types de mort pour des doses de radiations « raisonnables » semble bien inférieure aux trois types de morts précitées. Nous n'aborderons ici que les trois morts radioinduites précitées.

La mort mitotique : Le fragment chromosomique issu d'une cassure de l'ADN est soumis aux mêmes phénomènes d'aspiration que les chromosomes entiers. Cependant, si le fragment ne porte pas de centromère (il est dit *acentrique*), il est expulsé du noyau sous la forme d'un *micronoyau* (c'est l'*exonucléose*). Il peut rester dans le cytoplasme un certain temps, voire pendant un ou deux cycles et subir, comme le noyau principal, les condensations/décondensations de la chromatine suivant les phases du cycle. L'*exocytose* du *micronoyau* est la dernière étape de ce phénomène appelé *mort mitotique*. La mort mitotique est considérée comme le type de mort radioinduite le plus répandu. Le nombre de micronoyaux augmente linéairement avec la dose. Il a été corrélé à l'effet létal des radiations ionisantes (49,133) (Figure 12).

L'apoptose : *L'apoptose* est une mort dite *programmée* déclenchée par une CDB non réparée (134). Elle se traduit par une libération d'endonucléases qui digèrent massivement l'ADN (135,136). L'apoptose requiert généralement une protéine p53 fonctionnelle (137). Contrairement à la mort mitotique, l'apoptose se produit le plus souvent *en interphase* (G1,G2) (Figure 12).

La sénescence : Plus récemment encore, *l'arrêt irréversible en G1* a été décrit lui aussi comme une cause de mort radiobiologique (138). L'arrêt irréversible en G1 est également associé à une CDB non réparée et dépend de p53 mais surtout de p21 (139). A l'inverse de l'apoptose, il est abondant chez les fibroblastes témoins (en moyenne, 67% de cellules sont définitivement arrêtées avec une dose de 4 Gy) et il est compatible avec une existence prolongée de la cellule (on l'a même comparé à une forme de vieillissement, la *sénescence*) (Figure 12).

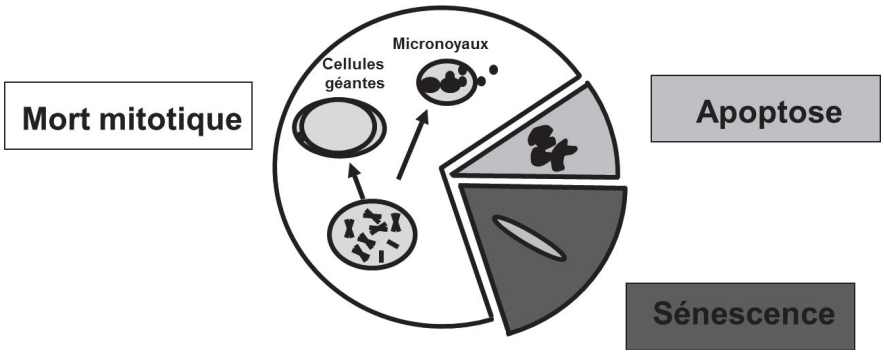


Figure 12 : *Représentation schématique de la contribution relative des différents types de mort cellulaire dans une population de cellules non-lymphocytaires et en croissance exponentielle après irradiation. La mort par sénescence serait majoritaire si les cellules étaient irradiées en quiescence.*

1.3.4 Représentation mathématique de la mort clonogénique en fonction de la dose

Modèle linéaire-quadratique (LQ) : Kellerer et Rossi ont proposé le modèle linéaire-quadratique dans le but de corriger les défauts des théories de la cible (2). Ce modèle propose que la cellule meurt soit par l'action d'un seul événement létal (composante linéaire), soit par l'addition de 2 événements sublétaux (composante quadratique) (Figure 13) :

- La composante linéaire : cette composante est l'équivalent de la composante du modèle à un coup en remplaçant $1/D_0$ par α, ce qui donne : $S(D)=e^{-\alpha D}$. Le paramètre α est considéré comme indépendant du débit de dose.

- La composante quadratique : cette composante représente la probabilité d'avoir deux évènements sublétaux qui varient tous les deux linéairement avec la dose. Cette probabilité prend alors la forme

- $\mathbf{S(D) = e^{-\beta D^2}}$, avec β qui varie en fonction du débit de dose.

$$S(D) = e^{-\alpha D - \beta D^2} \qquad (29)$$

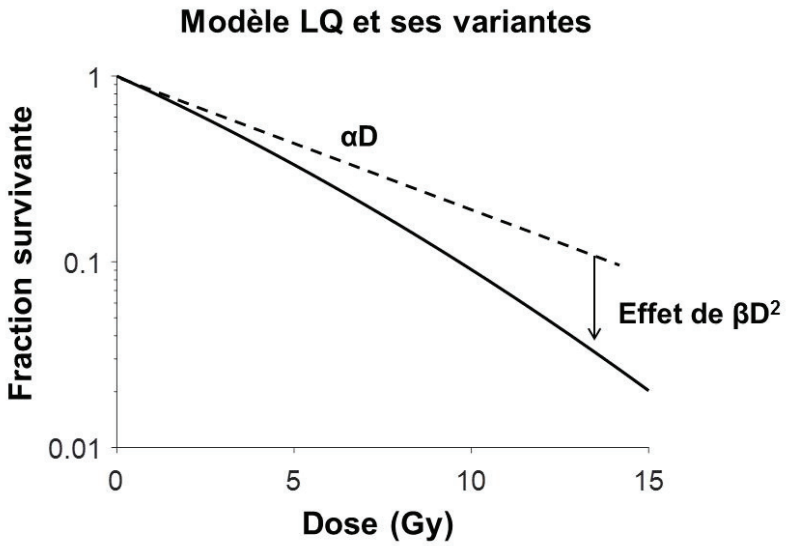


Figure 13 : *Représentation graphique du modèle linéaire-quadratique.*

En 1973, Chadwick et Leenhouts, ayant adopté le modèle LQ, ont proposé une autre interprétation des paramètres de la survie : ils considérèrent en effet que le paramètre α représente une CDB produite par une seule particule chargée, et β une CDB produite par 2 CSB assez proches (3). Cette dernière affirmation n'est pas vérifiée pour des doses utilisées en biologie ou en médecine (12).

Grâce à la théorie du transit d'ATM notre groupe a contribué à mieux comprendre la signification biologique de α et β : voir plus loin.

1.3.5 Contribution de l'apoptose dans la létalité cellulaire

A partir des années 1990, un grand nombre d'auteur, probablement aidé par l'apparition de tests apoptotiques simples et rapides, a considéré l'apoptose comme le type de mort cellulaire majoritaire (voire unique). Cet engouement atteint son apogée dans les années 2000 où l'apoptose devint même synonyme de mort cellulaire dans certaines publications (140,141). Rappelons d'ailleurs l'observation que la moitié des tumeurs sont p53 négatives interdit que l'apoptose, essentiellement dépendante de p53 dans sa forme sa plus fréquente, soit le mode de mort majoritaire. De même, la rapidité du processus de mort apoptotique et la disparition physique de la cellule qui lui est associée n'est pas compatible avec ce que l'on observe au niveau du tissu après irradiation.

1.4 L'hypersensibilité aux faibles doses

1.4.1 Principes généraux

En 1986, Joiner et al. ont observé sur des souris ce qui peut être considéré aujourd'hui comme l'une des plus grandes énigmes de la radiobiologie : l'hypersensibilité aux faibles doses (HRS pour *hypersensitivity to low doses*) (Figure 14) (154). Ce phénomène a été observé *in vitro* à travers les tests de clonogénicité. Il conduit à un excès d'environ 25% de létalité cellulaire entre 0.1 et 0.8 Gy sur tout type cellulaire, généralement à fort pouvoir prolifératif (155). Dans cette gamme de doses, le taux de survie est comparable à celui obtenu à des doses 10 fois plus fortes.

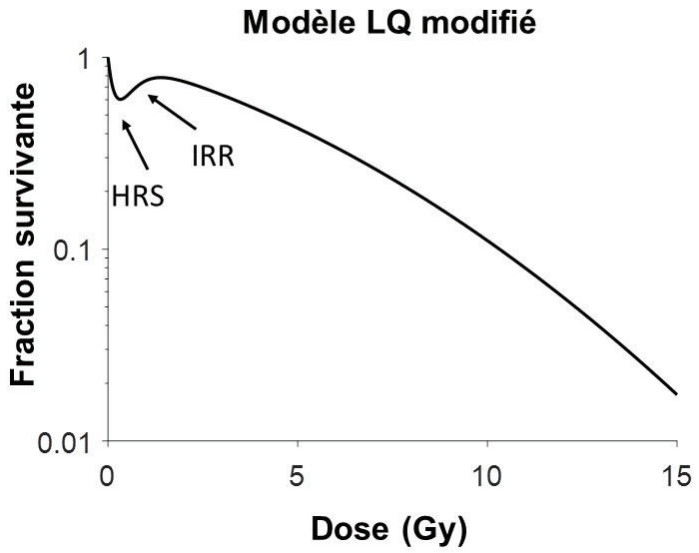


Figure 14 : *Représentation graphique de l'hypersensibilité aux faibles doses et du modèle LQ modifié pour le décrire.*

Joiner a considéré que ce phénomène peut être dû au changement de la conformation de la chromatine (157). Le même groupe de recherche suppose qu'il proviendrait d'un défaut des arrêts du cycle G_2/M ATM-dépendants (158). Enfin, d'autres études suggèrent que le problème pourrait venir des CDB (159,160).

Le phénomène d'hypersensibilité aux faibles doses n'est pas limité à une diminution de survie cellulaire mais observé également avec les CDB non réparées, les micronoyaux mais surtout avec des mutations, montrant ainsi que ce phénomène

concerne également la transformation cellulaire et donc pourrait avoir un impact dans la formation des cancers radioinduits pour des expositions faibles ou chroniques (161,162).

À noter que ce phénomène n'est pas observable dans tous les types cellulaires.

Nous verrons plus tard que la théorie du transit d'ATM développé par le laboratoire propose une explication moléculaire de ce phénomène.

2. RADIOBIOLOGIE CLINIQUE

2.1 Historique de la radiosensibilité individuelle

2.1.1 Radiosensibilité : histoire d'un mot

A l'exception de Victor Despeignes en juillet 1896 et de quelques tentatives isolées de radiothérapie (163), les rayons X furent surtout utilisés au début du XXème siècle pour la radiographie voire pour la radio-épilation (164,165). C'est probablement surtout cette dernière approche inattendue qui a documenté directement ou indirectement les réactions tissulaires radioinduites que l'on appelait alors « brûlures radiques ». La fréquence de ces événements tissulaires ont conduit les radiobiologistes à faire l'hypothèse de la nocivité des rayons X et de la sensibilité des tissus aux rayons X (166,167). Alors que l'on parle volontiers au début du XXème siècle de la notion de « sensibilité aux rayons », le premier usage du mot « radiosensibilité » se perd dans la décade 1900-1910. Dans le corpus de la Bibliothèque Nationale de France, la première occurrence de « radiosensibilité » est observée paradoxalement en mars 1910 sur la traduction d'une communication du médecin allemand Joseph Wetterer sur la radiothérapie des néoplasmes sous-cutanés, communication présentée lors du Congrès International de Physiologie à Paris (171).

2.1.2 Réaction tissulaire ou cancer radioinduit ?

Ce qu'il faut retenir c'est qu'une analyse syntaxique plus fine, initiée au cours de la rédaction de cet ouvrage et menée par Manon Britel dans notre Groupe suggère plusieurs périodes dans l'utilisation et le sens du terme « radiosensibilité ». Depuis la découverte des rayons X jusqu'en 1929-30, date du premier congrès international de radiologie, le terme « radiosensibilité » désigne plutôt la survenue des réactions tissulaires après irradiation. Après 1924, date du premier Congrès de Radiologie, la confusion existe entre l'acception historique et le risque de cancer radioinduit, probablement spécifique de l'usage anglophone « radiosensitivity » (Britel et al. soumis). D'ailleurs, cette confusion existe toujours puisque les phrases citées dans les documents de la Commission Internationale de Radioprotection (CIPR) comme « *Les enfants sont plus radiosensibles que les adultes* » ou « *le sein est l'organe le*

plus radiosensible » où la signification de la radiosensibilité est plutôt relative au risque de cancer radioinduit qu'à la survenue de réactions tissulaires. Une telle confusion pose le problème de la compréhension du lien possible entre radiosensibilité et prédisposition au cancer. Ce lien est complexe : les syndromes caractérisés par une grande radiosensibilité, comme l'ataxie télangiectasie, sont associés à de fortes prédispositions au cancer. Par contre, 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 (44).

Afin de mettre fin à la confusion entre ces différentes acceptions du terme « radiosensibilité » (risque de réactions tissulaires radioinduites ou risque de cancers radioinduits), notre Groupe a été à l'initiative de la proposition suivante, validée conjointement par l'Autorité de Sûreté Nucléaire et par l'Académie Française en décembre 2013 :

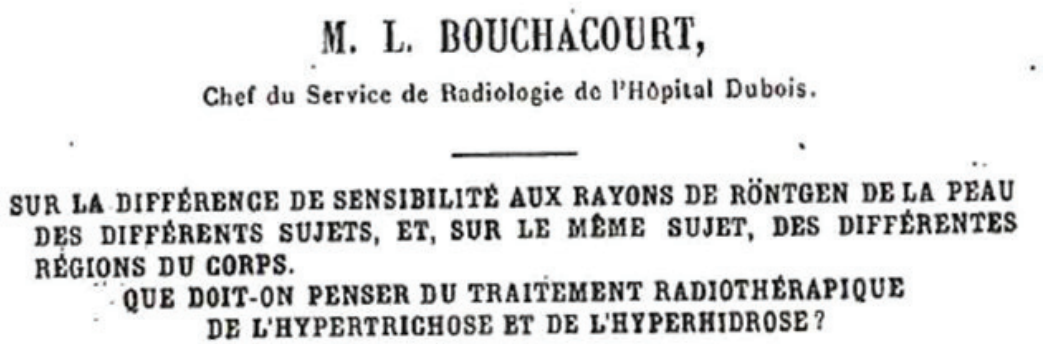
- conserver l'acception historique de « radio-sensibilité » en la liant au risque de réactions tissulaires, elles-mêmes liées à la mort cellulaire
- inventer le terme « radio-susceptibilité » pour désigner le risque de cancers radioinduits, eux-mêmes liés à la transformation cellulaire.

2.1.3 Radiosensibilité individuelle : 100 ans d'évidence

Comme on l'a dit plus haut, la radiothérapie anti-cancéreuse n'était pas la première application des rayons X (166,172,173).Toutefois, les différentes observations conduisirent la communauté scientifique à soulever pour la première fois la question de l'*idiosyncrasie* lors du Congrès de l'Association Française pour l'Avancement des Sciences (AFAS) en 1906 à Lyon (174), notamment grâce aux travaux de Jean Bergonié, véritable moteur des « électro-radiologistes » (175,176). En effet, après des discussions animées, les participants aux Congrès de Lyon proposèrent la motion suivante : «*La Section d'Electricité Médicale du Congrès tenu à Lyon admet après discussion qu'avec des doses égales évaluées avec les indicateurs actuels, certains individus dans des conditions spéciales peuvent présenter des réactions quelque peu différentes. »* (174). Un rapport est alors demandé à Fabien Arcelin sur les différences inter-individuelles après exposition aux rayons X. Cette étude deviendra le tout premier sondage adressé aux radiologues de l'époque (177). Il

sera présenté au Congrès de l'AFAS à Dijon en 1911. Après la présentation du sondage, Léon Bouchacourt expose son expérience sur l'irradiation épilatoire d'un couple de deux volontaires (164 ,165). Avec les travaux de Fabien Arcelin, sa communication, intitulée « *Sur la différence de sensibilité aux rayons de Roëntgen de la peau des différents sujets et, sur le même sujet, des différentes régions du corps.*» est la première publication sur le concept de radiosensibilité individuelle (164) (Figure 15).

Ainsi, alors que la notion de radiosensibilité individuelle était une évidence en 1911, la codification des traitements de radiothérapie pris de l'ampleur notamment grâce aux travaux de Regaud entre 1913 et 1940 (126): face aux contraintes pratiques et économiques, la prise en compte des différences interindividuelles s'arrêta progressivement. Les bombes au cobalt ou les modalités de radiothérapie standard virent le jour entre 1950 et 1970 et les différences des réponses inter-individuelles n'étaient plus une préoccupation majeure. Pourtant, progressivement, les premiers accidents de radiothérapie et les premiers cas mortels d'hyper-radiosensibilité survinrent après l'exposition de patients atteints d'ataxie télangiectasie ou de syndromes similaires (40,178-180). Plus récemment, en 2010, un patient hyper-radiosensible succomba après radiothérapie sans pour autant montrer des signes évidents d'une ataxie-télangiectasie (181). L'accident de sur-irradiation d'Epinal (182,183) souleva d'autres questions : les réactions tissulaires indésirables sont-elles le fait de la génétique ou d'une erreur de dosimétrie ? Ces réactions sont-elles fréquentes ? C'est l'objet des chapitres suivants.



M. L. BOUCHACOURT,

Chef du Service de Radiologie de l'Hôpital Dubois.

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.

QUE DOIT-ON PENSER DU TRAITEMENT RADIOTHÉRAPIQUE DE L'HYPERTRICHOSE ET DE L'HYPERHIDROSE ?

Figure 15 : *En-tête de la communication de Léon Bouchacourt sur la radiosensibilité individuelle (Congrès AFAS, Dijon, 1911) (164).*

2.1.4 Radiosensibilité : son existence et son importance

La réponse interindividuelle de la population générale à une dose standardisée de radiations ionisantes est aujourd'hui généralement décrite comme une courbe gaussienne, caractérisée par une valeur moyenne et sa déviation standard. Toutefois, aucun essai systématique n'a étayé une telle représentation (184) (Figure 16). D'ailleurs la représentation de la Figure 20A implique qu'il existe des individus hyper-radiorésistants en nombre équivalent à celui des individus hyper-radiosensibles et que le tableau clinique le plus probable est une radiosensibilité intermédiaire. Cette théorie « symétrique » ne va pas dans le sens dans le consensus adopté par la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) depuis plusieurs décennies (radiorésistance uniforme de la population). Cette théorie ne va pas non plus dans le sens du faisceau d'hypothèses suivant : si la cellule meurt car elle n'a pas réparé un nombre suffisant de dommages de l'ADN, la mort peut intervenir pour n'importe quel nombre de dommages pour peu que celui-ci soit au-dessus de ce seuil. Par contre, ces situations ne peuvent ne pas être équiprobables : il serait plausible que présenter un nombre faible de dommages non-réparés soit plus fréquent que de montrer un taux élevé de dommages non-réparés. Ainsi, *plus la radiosensibilité serait marquée, plus elle serait rare*. Cette hypothèse va également dans le sens de l'épidémiologie génétique : des syndromes comme l'ataxie telangiectasie liée à l'hyper-radiosensibilité ont une incidence de 1/100000 dans la population alors que les mutations de BRCA1 ou BRCA2 liés à une radiosensibilité tissulaire beaucoup plus faible ont une incidence de 1/500 à 1/1000 (166). Concernant la radiorésistance, quand tous les dommages de l'ADN sont réparés en-dessous du seuil évoqué plus haut, la cellule ne peut réparer plus et donc ne peut survivre plus. Ainsi, même si on peut imaginer une radiorésistance extrême et une radiosensibilité extrême, un nombre-seuil de quelques dommages de l'ADN par cellule impliquerait nécessairement une hyper-radiorésistance « butoir » mais une plus grande variété dans les niveaux de radiosensibilité. Si « *plus la radiosensibilité est marquée, plus elle est rare* » est une assertion vraie, on obtient alors une représentation semi-gaussienne de la radiosensibilité dans la population générale, telle que la figure 20B le montre. La sous-population des hyper-radiosensibles ataxiques qui présente une discontinuité dans la représentation que propose Burnet et al. en 1998, s'intégrerait alors dans la représentation asymétrique

que nous proposons : la population serait alors globalement radiorésistante, c'est-à-dire sans réactions tissulaires (grade 0) ce qui corroborerait les données épidémiologiques (167) et suggérerait l'existence d'une sous-population à la radiosensibilité significative mais modérée dont l'importance serait non négligeable.

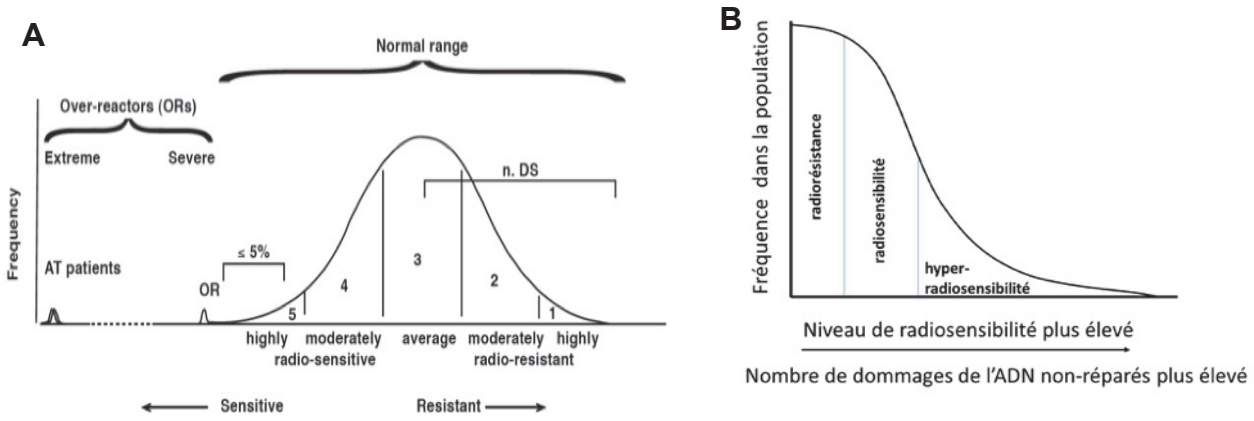


Figure 16 : *A. Répartition de la radiosensibilité individuelle au sein de la population générale d'après (184). Les doses maximales recommandées sur les patients souffrants de réactions tissulaires prescrites sont calquées sur les 5% de patients radiosensibles, sujets à des réactions inhabituellement sévères. B. Répartition de la radiosensibilité individuelle au sein de la population générale d'après notre théorie. En considérant une hyper-radiorésistance « butoir » et une population plutôt radiorésistante, plus la radiosensibilité est élevée, plus elle est rare.*

Alors que la notion de réponse individuelle paraissait plausible et était dans tous les esprits à la fin des années 1990, rien ne permettait de la prédire ou de la caractériser. C'est d'ailleurs ce qui ressort des recommandations de la CIPR où il est fait mention de facteur individuel mais avec le corollaire qu'aucun consensus technologique ne permet encore de le mesurer avec fiabilité (185).

2.1.5 Radiosensibilité ou erreur de dosimétrie ?

On compte environ 380000 nouveaux cas de cancers par an en France (surtout cancers du sein, de la prostate). Plus de la moitié de ces cas sont traités par radiothérapie. Une proportion non négligeable de ces patients, généralement estimée entre 5 et 20%, présente des réactions tissulaires qui peuvent limiter le bon déroulement du traitement, voire l'arrêter dans certains cas et augmenter la morbidité des patients. Ces réactions peuvent être par exemple des dermites mais aussi des rectites dans le cas des cancers de la prostate, des fibroses pour les

cancers de l'œsophage et du poumon, etc. Ces réactions peuvent être précoces (quelques jours) ou tardives (plusieurs mois, voire des années après traitement), en fonction du type de tissus et de l'organe considéré (185). D'un point de vue tissulaire, ces réactions observées chez les patients radiosensibles pourraient être similaires à des réactions observées chez des patients radiorésistants mais soumis à des doses plus fortes. Cette idée que les réactions puissent être le résultat d'un excès de dose a incité les radiothérapeutes a d'abord incriminer la dose *physique* délivrée avant d'examiner d'autres aspects du tableau clinique comme la radiosensibilité individuelle. Cette démarche est logique et aussi facilitée par le fait que les radiothérapeutes et les radiophysiciens sont des collaborateurs quotidiens alors que les radiobiologistes sont rares et moins intégrés dans les choix thérapeutiques. Ainsi, en plus de la complexité des phénomènes radiobiologiques à l'échelle microscopique, la grande majorité des radiothérapeutes ne se tournent pas naturellement vers une cause biologique pour expliquer les réactions de leurs patients.

Pratiquement, tout écart de plus de 5% sur la dose totale prescrite, que ce soit en surdosage ou en sous-dosage, peut être détecté cliniquement, et sera considéré comme un accident d'exposition aux rayonnements (186). Les expositions accidentelles majeures qui ont été rapportées jusqu'en 2000 ont concerné environ 2000 patients dans le monde et ont provoqué la mort d'environ 100 personnes (186). En France, 5 accidents de radiothérapie ont été recensés : Grenoble (2003), Lyon et Tours (2004), Epinal (2004 et 2005) (182) et Toulouse (2006 et 2007). C'est surtout après les accidents de sur-irradiation de Toulouse et d'Epinal, qui ont affecté plus de 545 patients, que l'IRSN, l'ASN (Autorité de Sureté Nucléaire) et la SFRO (Société Française de Radiothérapie Oncologique) ont proposé une échelle pour informer le public sur les événements de radioprotection affectant des patients de radiothérapie (Echelle ASN-SFRO) Les événements sont classés selon huit niveaux :

• les niveaux 0 et 1 sont utilisés pour classer les événements sans conséquence clinique pour le (ou les) patient(s) concerné(s)

• les niveaux 2 à 3 correspondent aux événements qualifiés d' « incidents »

• les niveaux 4 à 7 correspondent aux événements qualifiés d' « accidents »

La gravité des effets est appréciée en se référant à la classification clinique internationale (grades CTCAE), déjà utilisée par les praticiens. (187)

Pourtant, même la faible fréquence de ces accidents de sur-dosage, surtout dans le contexte actuel du contrôle-qualité organisé par tous les services de dosimétrie ne peut expliquer les réactions tissulaires observées (5 à 20% des patients). D'ailleurs, lors des accidents de sur-irradiation d'Epinal, bien que les mêmes erreurs de dosimétrie aient été commises sur tous les patients (environ 20% de excès de dose), un large spectre de sévérité des réactions tissulaires a été observé (182). Ainsi, en dépit d'un excès de dose physique constaté, des variations inter-individuelles sont systématiquement observées avec une dispersion quasiment gaussienne des grades de sévérité. Les réactions tissulaires observées sur les patients les plus radiosensibles pourraient donc suggérer des « équivalents d'excès de dose physique » bien plus élevés que ceux qu'une erreur de dosimétrie pourrait engendrer. Ceci montre que la connaissance du statut génétique des tissus sains du patient est indispensable à la fois dans le choix du traitement et dans la prévention des réactions tissulaires.

2.2 Réactions tissulaires radioinduites

2.2.1 Réactions précoces ou tardives ?

La radiothérapie peut produire des effets secondaires qui s'expriment au niveau tissulaire sous plusieurs formes suivant l'organe irradié, la dose, le rapport dose-volume et l'individu : saignements, dermites, rectites, troubles neurologiques, etc … (188,189). Alors que la communauté scientifique considère que les réactions tissulaires radioinduites pourraient être le résultat de cassures de l'ADN non-réparées, les mécanismes qui sous-tendent ce lien ne sont pas encore consensuels (190). En parallèle, une réflexion générale sur les causes inhérentes de la nature précoce ou tardive des réactions post-radiothérapiques a été engagée depuis au moins 20 ans. En particulier, il est proposé que les effets précoces puissent avoir une nature inflammatoire, dues au changement de la perméabilité des cellules et à la libération de médiateurs inflammatoires. Ils peuvent aussi être causés par la perte des cellules (ex : inflammation des muqueuses) (186,191). Les réactions tardives pourraient, quant à elles, avoir 2 causes : soit une blessure directe du tissu cible (ex: occlusions vasculaires induisant une nécrose profonde), ce sont des effets dits ‘’génériques’’ (192) ; soit des réactions précoces assez sévères (infection chronique, problèmes intestinaux causés par des ulcères sévères), ils sont alors des effets dits « conséquentiels » ou indirects (192).

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

Une dernière réflexion concernant l'usage de certains termes doit être également menées. En effet, les anglophones parlent de « acute » (pour aigu) et « late » (pour tardif). En toute rigueur, c'est le terme « early » (pour précoce) qui devrait être choisi

pour désigner les réactions précoces. Ainsi, le double sens de « acute » (aigu ou précoce) est à l'origine d'une certaine confusion.

2.2.2 Echelles de sévérité des réactions tissulaires

A ce jour, et dans le cas de la radiothérapie, seule l'expérience du clinicien permet de prendre des actions concernant les réactions radioinduites, sans être pour autant basées sur des critères biologiques et moléculaires. Plusieurs échelles de grades de sévérité de ces réactions ont donc été développées, notamment à partir de 1979 avec l'échelle WHO (World Health Organization), suivies de CTCAE (Common Terminology Criteria for Adverse Effects) dès 1983, RTOG (Radiation Therapy Oncology Group) dès 1984, LENT (Late Effects in Normal Tissues) dès 1995 et leurs évolutions plus récentes. Aujourd'hui, les échelles CTCAE et RTOG dominent (188,189,193). Ces échelles s'efforcent de proposer des grades de sévérité valables quel que soit l'endroit du corps où est reçue la dose de radiation et quel que soit le type de tissu réagissant. Ainsi, de fait, ces échelles de sévérités permirent avec la cotation d'un grade (généralement allant de 0 : pas de réaction à 5 : décès du patient) de gommer toute spécificité tissulaire puisque qu'une réaction d'un grade donné sur un tissu précis correspond en gravité à une autre réaction sur d'autres tissus. Bien que nécessairement subjective, ces classifications limitent les artéfacts et les erreurs entre observateurs. En effet, en pratique, elle laisse au moins 3 grades (2, 3 et 4 ; le grade 1 restant assez subjectif en pratique) pour quantifier la gravité de réactions tissulaires ce qui laisse une assez grande latitude dans les descriptions de la plaie (ex : rougeurs, érythème, érythème exsudatif, nécrose,..). De plus, un classement par plus de 2 catégories permet d'exclure en analyse mathématique les phénomènes binaires de « tout-ou-rien ». Quant aux grades extrêmes 0 et 5 (pas de réactions notables ou décès), les erreurs d'observation sont évidemment impossibles. Ainsi, sans a priori des aspects mécanistiques et phénoménologiques en amont des réactions tissulaires, les échelles de sévérité sont des outils précieux pour quantifier la réponse clinique des tissus sains après irradiation, indépendamment du lieu d'irradiation.

2.3 Syndromes associés à une radiosensibilité

Un grand nombre de syndromes génétiques associés à une radiosensibilité sont associés à un dysfonctionnement de la réparation des CDB, suggérant fortement

que les CDB sont à l'origine de la mort cellulaire radioinduite. Toutefois, l'incidence de ces syndromes reste rare (de l'ordre de 1/100000) (44). La figure 17 en fin de chapitre récapitule et classe la radiosensibilité de ces syndromes en fonction de leur fréquence.

2.3.1 Maladies de la signalisation ATM/ATR

Comme il a déjà été précisé, la kinase ATM est l'un des acteurs majeurs de la reconnaissance, la signalisation et la réparation des CDB (Figure en Annexes). L'ataxie télangiectasie (AT), le syndrome associé à la plus forte radiosensibilité connue chez l'homme est causé par la mutation homozygote d'ATM. Cette maladie a été décrite pour la première fois en 1926 par Syllaba et Hennen (194), puis ensuite par Madame Louis-Bar en 1941 (195). Son taux d'incidence est estimé à environ 1/100000 aux Etats-Unis et en Grande Bretagne (196). Les symptômes associés sont : ataxie cérébelleuse sévère avec une espérance de vie dépassant rarement les 30 ans (197), des télangiectasies oculo-cutanées (198), une synthèse déficiente des immunoglobulines IgA, IgE et IgG2, une forte prédisposition aux cancers (leucémies et lymphomes) et un remaniement spontané des chromosomes (199). Comme on l'a dit, les patients AT souffrent aussi d'une hyper-radiosensibilité (200). Les autres caractéristiques radiobiologiques associées à l'AT sont de nombreuses aberrations chromosomiques (197), l'absence de contrôle du cycle en G1 et d'inhibition de la synthèse de l'ADN (appelée improprement *synthèse radiorésistante*) (201,202). Bien que la plupart des patients AT souffrent d'une inactivation totale de la protéine, 10-15% de patients ataxiques variants (ATV) ont une pathologie moins sévère et des signes cliniques moins marqués. Les porteurs hétérozygotes (ATH), représenteraient environ 1% de la population mondiale avec un risque plus élevé de cancer du sein que la normale (203) mais avec une radiosensibilité peu marquée (42).

La kinase ATR, serait plus impliquée dans la réponse aux dommages de bases qu'aux CDB et aux UV plutôt qu'aux radiations ionisantes (60). ATR pourrait être encore plus indispensable que ATM à la viabilité de la cellule car seules des mutations ponctuelles de ATR ont été observées et forment le syndrome de Seckel dont la prévalence est inférieure à 1/1 000 000 (204).

2.3.2 Maladies de la réparation par suture

2.3.2.1 Mutations de Ku et DNA-PKcs

Chez l'homme, à l'exception de 2 lignées cellulaires (41,205-207), il n'existe pas de syndrome connu associé à des mutations des composants du complexe DNA-PK, très probablement car les composants du complexe DNA-PK (Ku70, Ku80 et DNA-PKcs) sont essentiels à la viabilité cellulaire au niveau embryonnaire. De plus, il faut noter que vis-à-vis de la phosphorylation du de l'histone H2AX, l'action de la kinase ATM est plus précoce et plus importante que celle de DNA-PK : en effet, dans les lignées cellulaires issues des patients AT, le nombre de foci γH2AX est très faible dès les premières minutes après irradiation alors qu'il est maximal dans les lignées mutées pour DNA-PKcs (43). Notons qu'il n'existe pas non plus de syndrome humain associé à des mutations des histones H2AX, très probablement pour des raisons structurelles. Pour finir, soulignons le fait que les lupus erythémateux peuvent être associés à une plus faible expression de la protéine Ku même si celle-ci est très abondante dans les cellules de mammifères (44).

2.3.2.2 Mutations de Ligase IV

L'action de la ligase IV (LIG4) vient en aval de celle de DNA-PK. Le partenaire protéique de la ligase IV est XRCC4 avec lequel elle s'associe pour former le complexe LIG4-XRCC4-XRCC4 (208,209). En 2001, un syndrome humain associé à des mutations de la ligase IV a été identifié par O'Driscoll *et al.* (40,210). Ce syndrome est caractérisé par une radiosensibilité et une immunodéficience très marquées, une forte pancytopénie, un retard de croissance et des aspects faciaux dysmorphiques. Le seul cas qui a été décrit est décédé 2 semaines suite à son traitement de radio-chimiothérapie (40,210).

2.3.2.3 Mutations de Artémis, Cernnunos et 53BP1

En aval de l'action de la ligase IV, certains acteurs protéiques ont été identifiés : c'est le cas de la protéine Artémis dont les mutations sont responsables du syndrome du même nom, associé à une forte immunodéficience et à une faible radiosensibilité. Toutefois la radiosensibilité du syndrome Artémis est peu marquée, probablement expliquée par l'action compensatrice d'une autre protéine qui aurait une fonction similaire (211). Artémis est une nucléase qui serait

indispensable pour le clivage de séquence en épingle à cheveux mais pas pour la phase essentielle de ligation (212).

Un autre facteur important mais non essentiel du NHEJ, XLF/Cernunnos, a été découvert. Il agirait en aval de la fonction de DNA-PK et de XRCC4-LIG4 (213,214). Les mutations de ce gène peuvent donner le syndrome Cernunnos qui rassemble retard mental, microcéphalie, lymphopénie, immunodéficience sévère et ligation fautive *in vitro* causant une radiosensibilité comparable au syndrome Artémis. Cinq patients ont été identifiés à ce jour (213,214).

L'absence de foci nucléaires de la protéine 53BP1, également requise pour certaines étapes du NHEJ, dans un patient montrant une forte immunodéficience, des aspects dysmorphiques, des difficultés intellectuelles et une radiosensibilité comparable à Artémis est à l'origine du syndrome RIDDLE (*Radiosensitivity, ImmunoDeficiency, Dysmorphic features and Learning difficulties*). Le syndrome RIDDLE n'est pas causé par des mutations de 53BP1 mais plutôt par des mutations de l'ubiquitine-ligase RNF168 dont l'action pourrait être compensée par une autre protéine (215-217).

Ainsi, vu l'importance de la réparation par suture dans la viabilité cellulaire, peu de syndromes associés à des mutations homozygotes de protéines majeures de la suture sont observés. Seuls sont décrits des syndromes associés à des mutations de protéines «secondaires» dont l'absence de fonction serait compensée par d'autres (44).

2.3.3 Maladies de la recombinaison non-homologue

2.3.3.1 Mutations de NBS1 : syndrome de Nijmegen

En 1981, Weemaes *et al.* ont décrit un syndrome appelé *Nijmegen breakage syndrome* (NBS) ou syndrome de Nimègue. Une microcéphalie, une petite stature, un retard mental, une forte prédisposition aux lymphomes et une immunodéficience en sont les principales manifestations cliniques (218). Les cellules $NBS^{-/-}$ sont caractérisées par une instabilité chromosomique (219-221). Elles sont hypersensibles aux radiations ionisantes et présentent une absence d'arrêt du cycle en G1 (219).

2.3.3.2 Mutations de MRE11

Des mutations de MRE11 ont déjà été identifiées chez trois patients (43,222). Historiquement, la première famille porteuse des mutations homozygotes de MRE11 qui a été décrite montrait des signes comparables à ceux de l'ataxie télangiectasie mais avec une intensité et une précocité des symptômes moins marquées. Le syndrome associé a donc été dénommé *Ataxia-Telangiectasia-Like-Disorder* (ATLD) (222). ATLD est un syndrome d'ordre neurologique avec une radiosensibilité comparable au syndrome de Nimègue mais sans être associée à une immunodéficience et une prédisposition au cancer (223,224).

2.3.3.3 Mutations de Rad50

En 2009, une étude publiée par Waltes et al. a décrit le cas d'une patiente montrant une mutation de Rad50. La patiente souffrait d'un retard mental et avait une petite stature ainsi qu'une microcéphalie et une face d'oiseau (218,225). La patiente a développé un lymphome malin à l'âge de 23 ans sans présenter d'immunodéficience sévère. Ses cellules ont montré une radiosensibilité comparable à un syndrome de Nimègue, c'est pourquoi le syndrome décrit a été dénommé *Nijmegen Breakage Syndrome Like-Disorder (NBSLD)* (218).

2.3.4 Les syndromes progéroïdes

Le syndrome progéroïde de Hutchinson-Gilford (HGPS), causé par les mutations de la lamine A, fait partie de la grande famille des laminopathies avec un vieillissement accéléré exceptionnel (226,227). Sa prévalence est de 1/1 00000. Associé à quelques rares cas de sarcomes, ce syndrome montre une radiosensibilité qui peut être considérée comme la troisième plus élevée chez l'homme (après les syndromes AT et ligase IV) (Tableau 2). Une telle radiosensibilité liée seulement aux mutations de la lamine A, protéine de la membrane nucléaire suggère qu'un défaut de réparation des CDB n'est pas forcément la seule cause de radiosensibilité (227). La farnésylation de la lamine A dont souffrent les patients HGPS contribuerait en effet à séquestrer dans le cytoplasme un grand nombre de protéines de réparation et de signalisation (227). La lamine A ne peut, *stricto sensu*, être considérée comme une protéine de réparation ou de signalisation des dommages alors que ses mutations sont

associées à des désordres évidents de la réponse radioinduite. L'ensemble de ces observations remet donc en cause le paradigme qui lie directement la radiosensibilité aux défauts de réparation de l'ADN. La très forte radiosensibilité des syndromes progéroïdes a donc été à l'origine de nos réflexions sur l'édification d'un nouveau modèle de réponse aux radiations (227) (Article V).

2.3.5 Maladies des protéines-supports

2.3.5.1 Mutations de BRCA1 et BRCA2

La protéine BRCA1 joue le rôle de support et est partenaire d'une multitude de substrats de phosphorylation d'ATM, étant également substrat de la protéine ATM. Les mutations homozygotes de BRCA1 ne sont pas viables chez l'homme (elles conduisent à une non-viabilité à l'état embryonnaire). En revanche, les mutations hétérozygotes de BRCA1 chez l'homme rendent compte de la majorité des cancers familiaux du sein et du sein + ovaire, leurs prévalence est d'environ 1/500 (228-230) .

Comme pour BRCA1, les mutations nullizygotes de BRCA2 n'existent pas chez l'homme (231,232). Les mutations hétérozygotes de BRCA2, dont la prévalence est d'environ 1/2000, rendent compte de la majorité des cancers familiaux de l'ovaire et du sein male. BRCA1 et BRCA2 seraient indispensables à l'action de Rad51 et Rad52 dans la recombinaison homologue active en G2/M (59).

2.3.5.2 Mutations des gènes FANC

L'anémie de Fanconi (FA) fait partie des syndromes héréditaires d'insuffisance médullaire touchant environ 1 naissance sur 1 000 000. Elle est souvent associée à des malformations congénitales (notamment microcéphalie), des défauts de croissance (petite taille), des affections cutanées et évolue généralement vers une aplasie ou une leucémie. La prédisposition au cancer liée à FA concerne surtout les lymphocytes et le cancer du sein (233). FA peut être causée par la mutation de 13 gènes (FANCA à FANCN) dont les protéines correspondantes ne montrent pas de fonctions particulières en soit mais sont associées à des complexes impliqués dans l'ubiquitination, la résistance aux agents alkylants et la réparation des CDB. Plutôt caractérisées par leur chimiosensibilité, les cellules provenant de patients FA montrent une

radiosensibilité faible mais significative (43,233). Notons que les protéines BRCA2 et FANCD1 sont identiques (234).

2.3.6 Autres syndromes liés à une radiosensibilité

On peut aussi ajouter à la liste des syndromes évoqués ci-dessus (Tableau 1) des réparatoses qui concernent la réparation de dommages radioinduits de l'ADN différents des CDB. C'est le cas de maladies liées à une forte photosensibilité comme Xeroderma Pigmentosum (XP) (235), la trichothiodystrophie (TTD) et le syndrome de Cockayne (CS) qui sont des réparatoses des nucléotides par excision-resynthèse (*nucleotide excision resynthesis* [NER]) (236,237) et des cancers du côlon héréditaires non polyposiques (*hereditary non-polyposis colon cancer* [HNPCC] (238) qui sont des réparatoses concernant les mésappariements de l'ADN (*mismatch repair* [MMR]) (239). Le lien causal exclusif entre radiosensibilité et réparation des CDB n'est pas remis en cause car il est tout-à-fait possible qu'après une irradiation une dysfonction du NER ou du MMR aboutisse à des CDB.

2.3.7 Syndromes radiosensibles non-réparatoses

D'autres syndromes sont associés à une radiosensibilité non négligeable alors que les protéines incriminées n'ont, soit pas encore de rôle connu dans les mécanismes de réparation des dommages de l'ADN, soit concernent des protéines du transport du cytoplasme au noyau comme les syndromes progéroïdes que l'on a vu plus haut. C'est notamment le cas des pathologies intestinales par mutation du gène *APC*, des syndromes d'Usher, de la chorée de Huntington (Article I et II,240,241)(Tableau 1). Alors que les protéines en cause ne sont pas impliquées directement dans la réparation des CDB, l'explication de leur radiosensibilité reste donc une des énigmes de la radiobiologie et remet en cause le paradigme établissant un lien direct entre défauts de réparation et radiosensibilité.

Ainsi, l'un des enjeux de mon travail est de mieux comprendre pourquoi un syndrome peut être associé à une radiosensibilité alors qu'il est causé par des mutations de protéines qui restent dans le cytoplasme.

Tableau 1 : *Principaux syndromes génétiques associés à une radiosensibilité*

Syndromes génétiques	Gène muté	SF2 (%)
Ataxie telangiectasie (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 telangiectasie (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*
Neurofibromatose type I	*NF1*	*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

*Les syndromes en italiques sont causés par des mutations qui restent cytoplasmiques ou membranaires. SF2 désigne la survie clonogénique à 2 Gy (voir plus loin).

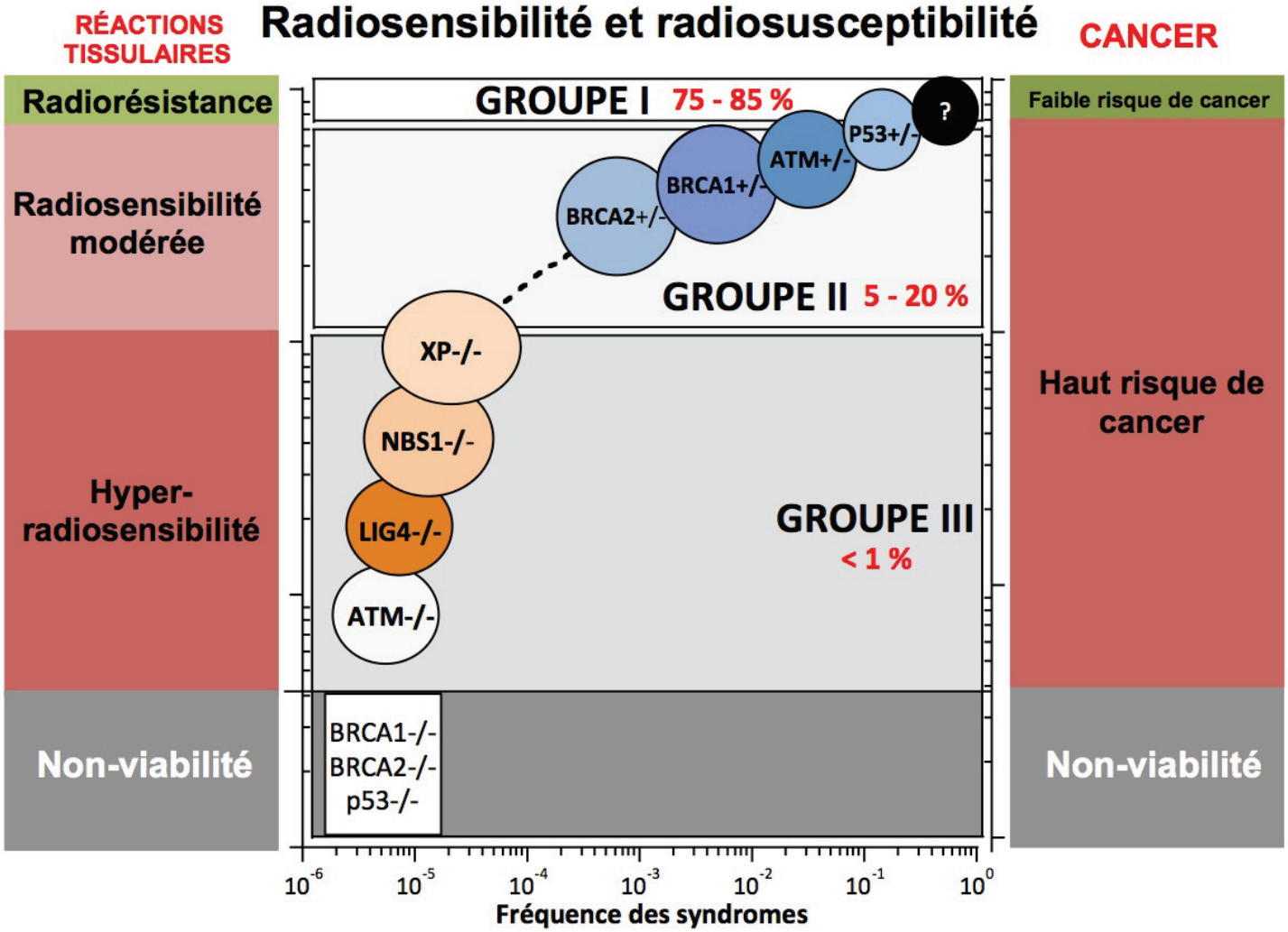


Figure 17 : *Principaux syndromes génétiques associés à une radiosensibilité et/ou une prédisposition au cancer en fonction de leur fréquence.*

3. APPROCHE GENERALE DU LABORATOIRE

3.1 Justification des choix techniques

3.1.1 Choix des tests fonctionnels de réparation des CDB

Depuis les années 1990, 3 grandes approches ont été adoptées pour déterminer les bases moléculaires de la radiosensibilité (49):

- l'approche *génomique*, qui consiste à déterminer, par la connaissance des *séquences des gènes*, certaines mutations qui seraient la cause de la radiosensibilité. C'est le cas notamment de la recherche des polymorphismes nucléotidiques simples (*single nucleotide polymorphism*, SNP) (244).
- l'approche *protéomique*, qui consiste à déterminer, par la connaissance de *l'expression des gènes*, des protéines dont la régulation conditionnerait la réponse aux radiations (245)
- l'approche *fonctionnelle*, qui consiste à déterminer, par la connaissance des *fonctions de gènes* si et comment le rôle biologique de certaines protéines peut être impliqué dans la radiosensibilité (49).

Comme on l'a vu plus haut, des données de littérature de plus en plus nombreuses montrent que les CDB sont les dommages de l'ADN les mieux corrélés à la létalité cellulaire et à la toxicité - si elles ne sont pas réparées - et à l'instabilité génomique et au risque de cancer - si elles sont mal réparées (246,247). A l'origine établie pour les CDB radioinduites, une telle conclusion semble être valable aussi pour de nombreux agents cassants de l'ADN (248-250). Dès lors, une évaluation du risque toxique et cancérogène basée sur la quantification des CDB et des fonctionnalités de leur voie de réparation apparaissait donc comme logique. Outre les conclusions de la littérature, ces constats se basent sur 3 points essentiels :

- la très grande majorité des syndromes associés à une radiosensibilité significative sont causés par la mutation de protéines impliquées dans la réparation et la signalisation des CDB (on verra cependant plus loin que l'étude des exceptions à cette observation est à l'origine du modèle du transit cyto-nucléaire d'ATM).

- les CDB sont à l'origine des cassures chromosomiques, événement cytogénétique dont l'implication dans la létalité ou la transformation cellulaire fait consensus (246).
- de tous les dommages radioinduits de l'ADN, les CDB sont les seules dont l'induction et/ou le rythme de réparation est modulé comme la radiosensibilité, par l'oxygénation, l'hyperthermie, ou le transfert linéique d'énergie (36).

En dépit de ces arguments, la popularité des expériences de génomique ou de protéomique (plus souvent vantées pour leur rapidité, leur simplicité et le nombre d'individus concernés que pour leurs performances statistiques – voir plus loin) a occulté l'intérêt des tests fonctionnels concernant les CDB dans la détection de la radiosensibilité. D'ailleurs, ces derniers devenaient de moins en moins accessibles car leur mise en place fait souvent appel à un « savoir-faire » technique important. En parallèle, en ne suivant toujours aucune logique, les tests apoptotiques, à partir de lymphocytes, devenaient également populaires en dépit d'artéfacts techniques qui ne se révélèrent que très récemment. (49,247,251).

3.1.2 Choix des modèles cellulaires humains

Les données radiobiologiques (non-épidémiologiques) qui constituent la base des règles de radioprotection sont essentiellement issues de modèles animaux. La plupart des modèles moléculaires mécanistiques de la réparation des dommages radioinduits, du contrôle du cycle ou de la mort cellulaire ont été également étayés par des données issues de modèles animaux. Le développement des recherches depuis ces 20 dernières années n'a pas démenti ce constat (49,251,252). Pourtant, l'usage de modèles animaux en radiobiologie peut être facilement contesté par au moins 2 arguments :

- **l'homologie de séquence** et l'homologie *fonctionnelle* des gènes des espèces animales sont loin d'être vérifiées avec les gènes humains correspondants. D'ailleurs, l'homologie des gènes entre espèces est généralement basée sur une simple affirmation d'un groupe d'auteurs sur l'existence de certains domaines en commun. L'exemple représentatif est le gène *brca1* du rongeur qui n'a que 58% d'identité avec le gène humain BRCA1. La mutation de brca1 chez le rongeur ne conduit à aucune prédisposition au cancer du sein alors que chez l'homme, les mutations hétérozygotes $BRCA1^{+/-}$ augmentent d'un facteur 6 à 10 le risque de cancer du sein (49,253).

- **la taille du noyau des modèles animaux** est généralement inférieure à la taille d'un noyau humain. Par voie de conséquence, la cible étant plus petite, les animaux sont plus radiorésistants que l'homme (ex : la dose létale moyenne est de 15 Gy chez le rat alors qu'elle est de 4,5 Gy chez l'homme). Ainsi, toutes les courbes effet-dose et les valeurs de seuil sont différentes suivant les espèces (49,251,252).

Ainsi, en dépit des difficultés pratiques de culture cellulaire pour les lignées humaines, notre groupe a délibérément choisi de n'utiliser que des cellules humaines non-transformées. Par contre, le choix pouvait se porter sur les lymphocytes ou les fibroblastes de peau. Là encore, l'argumentation se doit d'être rigoureuse :

- **durée de vie en culture :** les lymphocytes ont une durée de vie limitée en culture, ce qui pousse généralement les laboratoires à les immortaliser par le virus Epstein-Barr (EBV) dont l'effet peut conduire à une modification drastique d'un grand nombre de fonctions géniques et à une plus grande radiorésistance. A l'inverse, les fibroblastes de peau sont plus résistants en culture (une vingtaine de passages sont possibles) et ils supportent mieux la conservation dans l'azote liquide (143,254,255).
- **contribution de la mort par apoptose** : Comme on l'a dit plus haut, l'apoptose n'est pas la mort prépondérante en radiobiologie. Par contre, c'est la mort majoritaire pour le cas particulier des lymphocytes. C'est pourquoi ce type particulier de cellules n'est pas forcément représentatif de la réponse aux radiations de la majorité des tissus humains.
- **cycle cellulaire :** les fibroblastes se mettent naturellement en phase de plateau (quiescence ou G0/G1) grâce à la propriété d'inhibition de contact qui garantit l'homéostasie. Ce n'est pas le cas des lymphocytes qui peuvent évoluer dans le cycle et donc ne pas offrir une population homogène de cellules.
- **représentativité :** en plus des spécificités évoquées ci-dessus, on peut s'interroger sur la vraie représentativité des lymphocytes pour une réponse aux radiations qui va surtout provoquer l'inflammation du tissu conjonctif. En effet, dermites et rectites peuvent-elles être fidèlement prédites par l'analyse de la réponse des lymphocytes qui, par la taille de leur noyau et de leur cytoplasme, n'ont pas la même radiosensibilité que des fibroblastes (255).

3.2 Les acquis du laboratoire depuis 2003

3.2.1 Corrélation entre toxicité et CDB non réparées

Dès 2003, des techniques d'immunofluorescence avec le biomarqueur γH2AX ont permis de détecter chaque CDB dans chaque noyau de cellules. Par ailleurs, cette technique permit aux radiobiologistes de mesurer des effets de l'ordre du mGy. L'analyse des effets biologiques des conditions compatibles avec certaines expositions professionnelles ou médicales est devenue alors possible (55). Toutefois, à l'époque, aucun élément ne pouvait déterminer si les foci γH2AX reflétaient *toutes* les CDB induites par les radiations ou seulement les CDB reconnues par un mode de réparation particulier comme la suture (NHEJ). En effet, en 2003, Rothkamm et Löbrich ont montré qu'environ 40 foci γH2AX étaient formés par Gy dans les cellules irradiées testées (55). Toutefois, dans leur article princeps, l'un des plus cités de la littérature en radiobiologie, seulement 2 lignées fibroblastiques (une radiorésistante et une hyper-radiosensible ($LIG4^{-/-}$)) ont été utilisées et les lignées $ATM^{-/-}$ ou des lignées de radiosensibilité modérée étaient les grandes absentes de l'étude. On verra plus tard que seuls les deux exemples pris montraient 40 foci γH2AX par Gy. Ce résultat pouvait donc s'interpréter en soulignant l'universalité des foci γH2AX à détecter toutes les CDB. Dès les premières applications de cette technique dans notre groupe de recherche sur des lignées de radiosensibilité modérée, nous avions noté que le nombre fatidique des 40 CDB par Gy n'était pas systématiquement vérifié, ce qui contredisait déjà les conclusions de Rothkamm et Löbrich. Ainsi, alors que la production « physique » d'environ 40 CDB par Gy dans les fibroblastes humains n'était pas remise en cause, il a fallu introduire la notion de *reconnaissance* de CDB par chacun des modes de réparation, cette reconnaissance pouvant ne pas être maximale pour tous les statuts génétiques.

Toujours à partir de 2003, le laboratoire d'accueil commença à rassembler un très grand nombre de lignées fibroblastiques humaines provenant de syndromes génétiques associés à une radiosensibilité significative. A travers ce projet dénommé CELLINE, le laboratoire entreprit d'étudier l'induction et le rythme de réparation des CDB en utilisant plusieurs techniques comme l'électrophorèse et l'immunofluorescence avec de nombreux biomarqueurs (43). En plus du marqueur

γH2AX, d'autres furent utilisés, notamment pDNA-PK et MRE11, pour mesurer respectivement l'activité kinase DNA-PK impliquée dans la réparation par suture et l'activité endonucléase MRE11 impliquée dans la recombinaison non-homologue (fautive). La distinction entre ces deux modes de réparation en G0/G1 avait déjà été évoquée à travers les artéfacts techniques observés en co-immunofluorescence (56).

En 2008, à partir de 40 lignées fibroblastiques représentant 8 syndromes génétiques différents, la valeur de la survie clonogénique à 2 Gy (SF2) 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 semblait également valable pour toutes les cellules de mammifères (43). 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 γH2AX et du taux de foci MRE11: groupe I, radiorésistance ; groupe II, radiosensibilité modérée ; groupe III : hyper-radiosensibilité (43) (Figure 18).

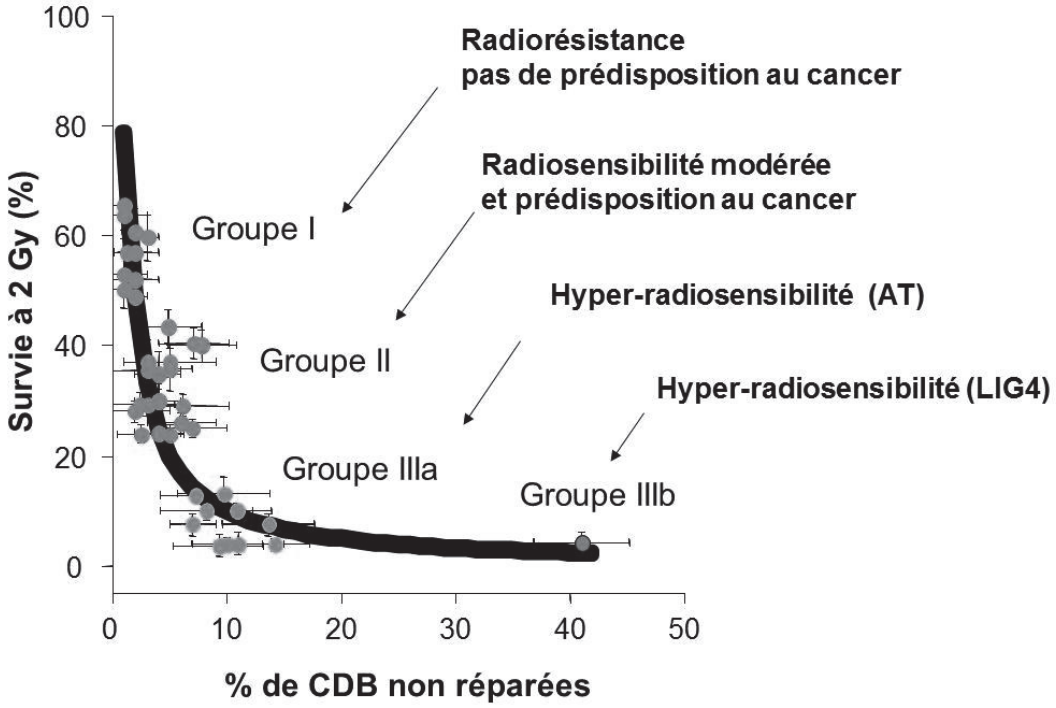


Figure 18 : *Classification de la radiosensibilité en 3 groupes proposée sur la base des CDB non réparées à 24h d'après (43).*

3.2.2 Genèse du modèle du transit cyto-nucléaire d'ATM

En parallèle au projet CELLINE qui se poursuit encore au laboratoire, la collecte de fibroblastes issus de patients traités par radiothérapie et ayant montré une radiosensibilité clinique significative sous la forme de réaction tissulaire débuta. Ce projet fut appelé COPERNIC (Collection pour l'étude de la radiosensibilité au niveau clinique).

En accumulant un très grand nombre de biopsies de peau (plus de 200 aujourd'hui), les premières conclusions furent les suivantes :

- plus que les foci pDNA-PK, les foci pATM apparurent très informatifs. Cette constatation était notamment renforcée par l'effet du traitement statines+biphosphonates (traitement ZOPRA) qui semblait augmenter le nombre de foci pATM dans le noyau (227,Article I). L'action du traitement ZOPRA, rendait les cellules plus radiorésistant et facilitait la réparation des CDB. Le fait de moduler la réponse aux radiations en augmentant le nombre des foci pATM dans le noyau suggérait le transit des proteines ATM du cytoplasme au noyau. Il est important de noter ici que dès 2008, l'hypothèse du transit d'ATM était émise dans notre groupe.

- les critères de sélection pour les groupes I, II et III définis précédemment avec la collection CELLINE apparaissaient comme valables pour les cellules des patients de la cohorte COPERNIC.

  Ainsi, les caractéristiques radiobiologiques issues des syndromes génétiques rares ou des réactions tissulaires révélées après radiothérapie étaient suffisamment cohérentes pour que les données CELLINE et COPERNIC puissent être fusionnées dans un ensemble cohérent. En parallèle, nous devions intégrer dans une explication générale les données du transit d'ATM en les étayant. Dans nos hypothèses de base, les CDB seraient majoritairement prises en charge par le mode de réparation par suture dont l'initiation passe par la phosphorylation ATM-dépendante de l'histone H2AX (γH2AX). En cas de retard du transit, les CDB seraient soit non-reconnues donc non-réparées par suture soit pourraient être prises en charge par le mode minoritaire de réparation fautive de type recombinatoire dépendant de la nucléase MRE11 et inhibé par le passage de ATM dans le noyau. L'équilibre entre ces deux modes serait donc contrôlé par la protéine ATM à travers son transit du cytoplasme dans le noyau et son activité kinase. Des foci γH2AX moins nombreux pouvaient suggérer un retard de transit d'ATM. Les foci nucléaires MRE11 pouvaient indiquer alors un arrêt de l'activité nucléasique de MRE11 (43,59,77) (Figure 19). Toutefois, toutes ces hypothèses émises dès l'année 2009 dans le laboratoire devaient être documentées et validées par un grand nombre de cas et réunies sous une interprétation biologique des paramètres α et β du modèle LQ, la description mathématique de référence pour la réponse aux radiations.

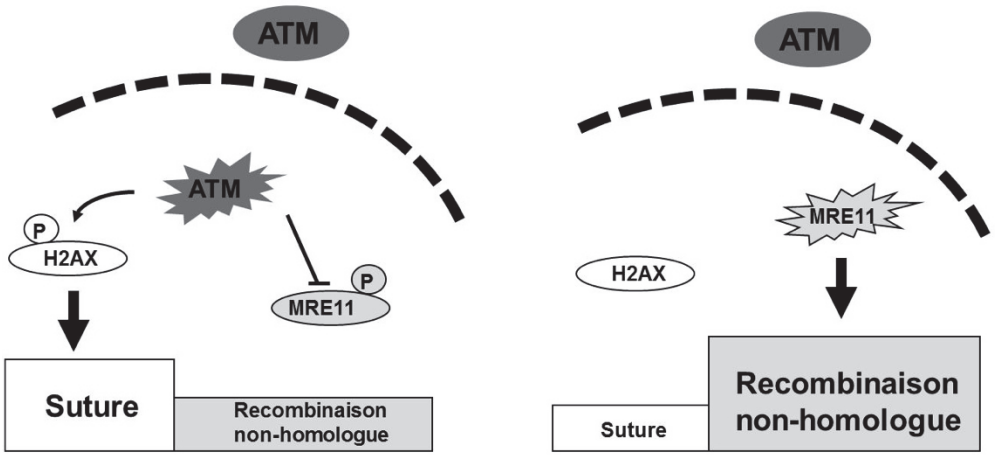


Figure 19 : *Notre modèle pATM/MRE11/ γH2AX sur des cellules en G0/G1 expliquant la stimulation de la suture ou l'inhibition de la recombinaison MRE11-dépendante par le transit cyto-nucléaire d'ATM.*

Ces hypothèses expliqueraient 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, elles permettraient de distinguer les effets tissulaires (*radio-sensibilité*) des effets carcinogènes (prédisposition au cancer radioinduit ou *radio-susceptibilité)*. En tous cas, elles serviraient de support au développement de tests prédictifs de radiosensibilité individuelle innovants.

3.2.3 Interprétation biologique du modèle LQ

Le lien mathématique de la radiosensibilité individuelle avec la dose est décrit par la théorie de la cible avec l'hypothèse que les évènements-clés de la mort cellulaire radioinduite s'effectuent seulement dans le noyau (53). En 1972, Kellerer et Rossi, puis en 1973, Chadwick et Leenhouts ont proposé une signification biologique aux paramètres α et β. Pourtant, comme on l'a dit dans l'Introduction, ces interprétations n'ont pas résisté à la réalité statistique. Enfin, le modèle de la cible, le modèle LQ ou ses variantes ne peuvent expliquer :

- le phénomène d'hypersensibilité aux faibles doses (une formule modifiée du LQ a déjà été proposée (157), mais aucun modèle moléculaire mécanistique n'était alors disponible) ;
- la radiosensibilité de certains syndromes génétiques qui sont causés par des mutations de protéines cytoplasmiques (43,44) ;

- la radiosensibilité de l'ataxie télangiectasie, la maladie la plus radiosensible connue est causée par la mutation d'ATM. Cette dernière a longtemps été considérée une protéine nucléaire car « elle est impliquée dans la réparation de l'ADN ». L'évidence expérimentale montrera plus tard que cette protéine est en fait majoritairement cytoplasmique (46,274,275).

Tant qu'il n'avait pas reçu une explication mécanistique, le modèle LQ restait empirique, mais toujours perçu comme le modèle le plus adéquat pour décrire la survie (147). Le rapport α/β est toujours largement utilisé par les radiothérapeutes pour prédire les réponses tardives (α/β faible, de 1.5 à 5 Gy) ou précoces (α/β élevé, de 6 à 14 Gy). Alors que le modèle LQ a été exploité pendant 40 ans afin de décrire la réponse aux radiations et de guider les cliniciens dans le choix du traitement de radiothérapie, l'interprétation de ses paramètres biologiques n'était donc pas encore résolue. Pendant 12 ans, notre groupe de recherche a accumulé quelques centaines de lignées fibroblastiques de peau provenant de patients traités par radiothérapie et présentant des réactions tissulaires, et de patients souffrants de syndromes génétiques bien caractérisés (43,46, Article I). Au début de mes travaux de thèse, Larry Bodgi et Nicolas Foray ont modélisé mathématiquement l'hypothèse d'un transit radioinduit de la protéine ATM et aboutirent à la formule LQ. La thèse de Larry Bodgi qui en découla proposait ainsi une théorie du transit d'ATM expliquant biologiquement les paramètres α et β : c'est l'objet de ce qui suit.

3.2.3.1 Formule unique pour décrire la relocalisation des protéines

Comme évoqué plus haut, en réponse à n'importe quel agent cassant de l'ADN, certaines protéines de signalisation et de réparation des dommages de l'ADN se relocalisent sous forme de foci nucléaires, visibles par immunofluorescence, généralement du fait de leur phosphorylation par des kinases et en obéissant à 2 phases cinétiques :

- La phase d'apparition des foci: pendant laquelle le nombre de foci augmente jusqu'à atteindre une valeur maximale à un rythme, une valeur et un temps post-irradiation qui dépendent de plusieurs paramètres tels que la dose et le facteur individuel. Une telle phase pourrait être précédée par un transit cyto-nucléaire de certaines protéines, et conduire à la *reconnaissance* des dommages de l'ADN ;

- La phase de disparition des foci: pendant laquelle le nombre de foci diminue jusqu'à une valeur résiduelle et à un rythme qui dépendent de plusieurs paramètres tels que la dose et le facteur individuel. Une telle étape est généralement interprétée comme étant celle de la *réparation* des dommages de l'ADN.
  Cependant, avant les phases de *reconnaissance* et de *réparation*, il faut évidemment considérer la phase d'*induction* des dommages de l'ADN. Cette phase biochimique est instantanée. Cette étape ne dépend que de la taille des cellules, de la nature des agents cassants et de la dose (ou concentration) délivrée. Dans le cas des rayons X ou gamma, les données de la littérature et du laboratoire indiquent que pour des fibroblastes humains non-transformés on compte environ 40 CDB par Gy par cellule, indépendamment de la radiosensibilité (39,43).

  Historiquement, c'est d'abord la phase de réparation qui a été décrite mathématiquement. En effet, les cinétiques de réparation des CDB montrant une forme de décroissance rapide en fonction du temps ont suggéré une description par une exponentielle négative ou une fonction inverse. C'est cette dernière qui a été choisie après une longue analyse de plusieurs dizaines de cinétiques.

  La partie montante des cinétiques de foci est apparue avec les données d'immunofluorescence γH2AX qui permettait, contrairement à la PFGE, de sonder des temps post-irradiations plus précoces. Après induction, il est raisonnable d'imaginer une période de latence avant la mise en place du processus de reconnaissance. Plus le temps post-irradiation s'écoule, plus le taux de reconnaissance augmente jusqu'à atteindre un seuil. Si ce seuil correspond au nombre de CDB induites, la reconnaissance est totale. La cinétique de reconnaissance des CDB pourrait donc être décrite par une fonction sigmoïdale. Là encore, c'est par une analyse de plusieurs dizaines de cinétiques de foci que le groupe a proposé une formule décrivant la phase de reconnaissance.

  Ainsi, la fonction finale décrivant à la fois induction, reconnaissance et réparation des CDB est le produit des 3 fonctions détaillées ci-dessous. Cette formule pouvant décrire la cinétique d'apparition/disparition des foci nucléaires de n'importe quelle protéine a été appelée la formule de Bodgi (Figures 20 et 21).

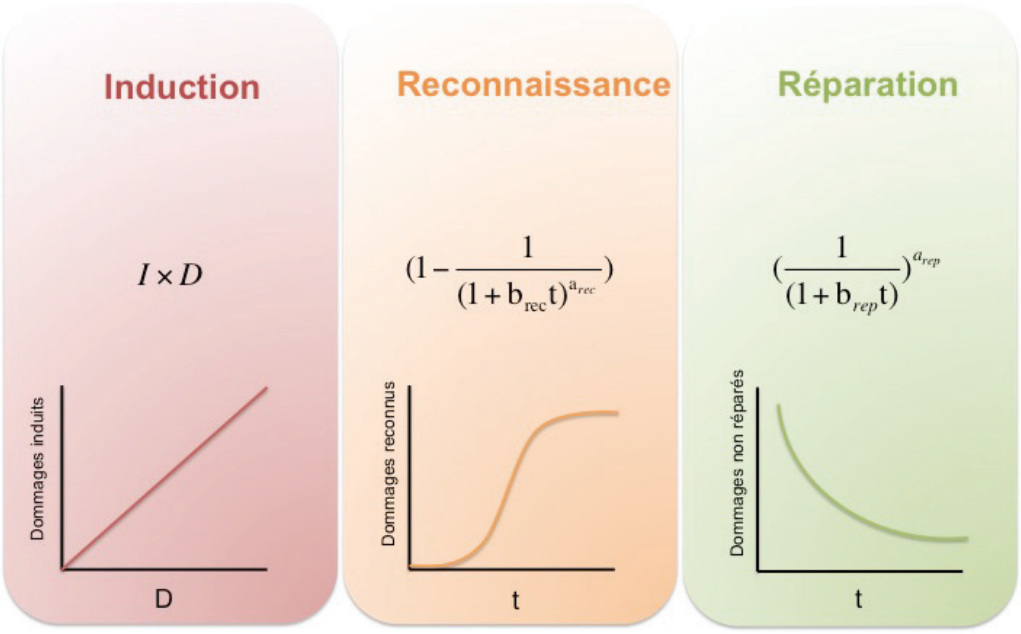


Figure 20 : *Représentation schématique de la fonction de Bodgi. a_{rec}, a_{rep}, b_{rec} et b_{rep}, sont paramètres d'ajustement détaillés dans Bodgi et al. 2013 (46)*

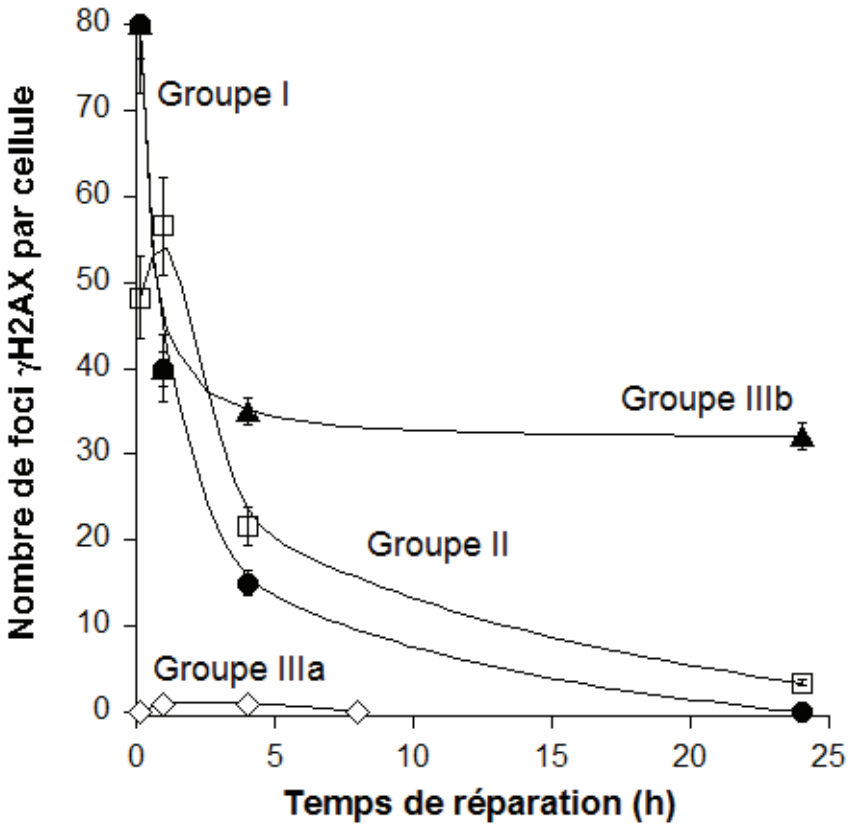


Figure 25 : *Illustration de la variété des formes que peut prendre la fonction de Bodgi pour décrire les différents cas représentatifs de cinétiques de foci γH2AX. Chaque point représente la moyenne ± l'écart-type de la moyenne de 3 expériences indépendantes. Les lignées fibroblastiques représentées sont : HF19 (groupe I) ; 12CLB (groupe II) ; AT5BI ATM$^{-/-}$ (groupe IIIa) ; 180BR LIG4$^{-/-}$ (groupe IIIb).*

3.2.3.2 Interprétation biologique du modèle LQ

Bodgi et Foray ont ensuite décrit mathématiquement le transit radioinduit de la protéine ATM. Ils ont en effet considéré le cytoplasme et le noyau comme deux compartiments indépendants et fait trois hypothèses fondamentales :

- Parmi les dommages radioinduits de l'ADN, ce sont les CDB qui provoquent la mort cellulaire si elles sont non réparées, ou l'instabilité génomique si elles sont mal réparées (59,246).
- la réponse aux radiations ionisantes (notamment à la radiothérapie) concerne principalement les cellules quiescentes car elles sont majoritaires dans le corps humain. Parmi les différents modes de réparation des CDB, la suture est responsable de la réparation de la plus grande majorité des CDB des cellules de mammifères, notamment quiescentes (53).
- ATM diffuse du cytoplasme au noyau pour assurer la reconnaissance de la majorité des CDB radioinduites qui seront réparées par suture. Cette étape est reflétée par la phosphorylation de l'histone H2AX (γH2AX) (46, Article I).

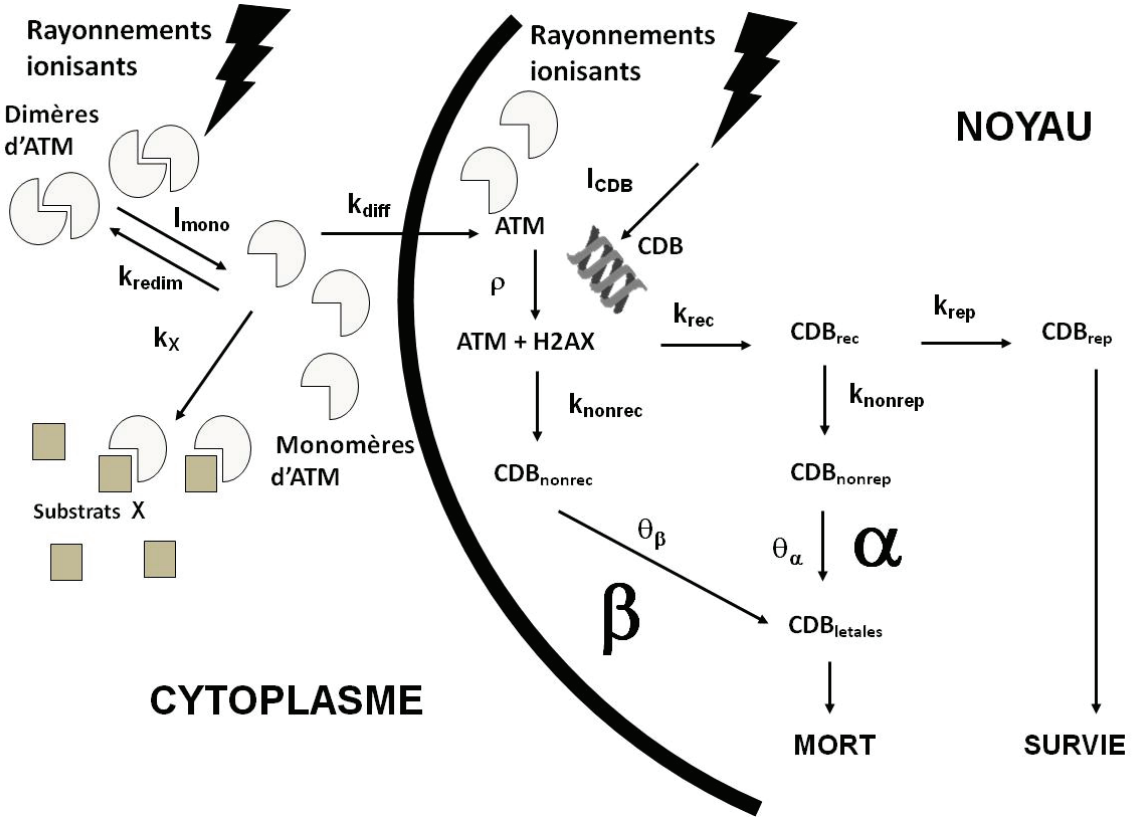


Figure 21 : *Le modèle basé sur le transit cyto-nucléaire radioinduit d'ATM.*

Six étapes ont été considérées :

- Etape 1: Induction des CDB et monomérisation d'ATM : l'irradiation produit une monomérisation des dimères d'ATM, forme majoritaire de la protéine ATM dans le cytoplasme. En même temps, l'irradiation produit des CDB dans le noyau

- Etape 2: Redimérisation d'ATM ou réassociation : les monomères d'ATM peuvent se redimériser ou s'associer à des protéines dites X pour former des complexes X-ATM.

- Etape 3 : Diffusion des monomères ATM : Les monomères ATM qui ne se réassocient pas entre eux ou avec des protéines X, sont supposés diffuser vers le noyau : ils arrivent « actifs », c'est-à-dire prêts à phosphoryler H2AX.

- Etape 4 : Reconnaissance des CDB par ATM : Sans faire aucun *a priori* sur la façon dont ATM transite du cytoplasme au noyau, la loi de diffusion de Fick (le modèle de transport le plus général) a été choisie pour décrire le rythme de diffusion ainsi que le rythme de reconnaissance des CDB par phosphorylation de H2AX.

- Etape 5 : Réparation des CDB : Afin d'être réparée, une CDB doit être reconnue. Dans la littérature, les CDB qui ne sont pas réparées après certain temps post-irradiation sont généralement considérées comme des dommages irréparables (289). On peut alors définir 2 catégories de CDB irréparables:

les CDB de type α: CDB reconnues mais non-réparées

les CDB de type β: CDB non-reconnues et donc non-réparées

- Etape 6 : CDB létales irréparables et survie : Parmi les CDB irréparables, certaines peuvent ne pas participer à la mort cellulaire, notamment à cause de la condensation de la chromatine ou de leur localisation spécifique dans le noyau qui limiteraient l'espace entre les brins par exemple ou des conséquences significatives sur l'organisation de la chromatine. Une telle hypothèse conduisit Larry Bodgi et Nicolas Foray à introduire la notion de la *tolérance* des cellules aux CDB non-réparées, définie par θ, une fonction dépendante de la dose. La fonction θ représente l'inverse de la fraction des CDB létales de type α ou β (Figure 21).

Ainsi, si on considère que la survie cellulaire est causée par la réparation systématique de *toutes les CDB radioinduites*, et que les CDB létales irréparables sont des évènements rares, la survie cellulaire S(D) des cellules irradiées peut être considérée comme une loi de Poisson :

$$S(D) = e^{-\mu(D)} \qquad (2)$$

Afin d'être en accord avec le modèle LQ historique (2,3), il faut :

$$\mu(D) = \alpha D + \beta D^2 \qquad (103)$$

Si $N_{nonrep}^{rec}(D)/\theta_\alpha$ désigne le nombre de CDB reconnues mais non réparées qui sont létales, et $N_{nonrep}^{nonrec}(D)/\theta_\beta$ désigne le nombre de CDB non reconnues et donc non réparées qui sont létales, alors il faut pour retrouver la formule LQ :

$$N_{nonrep}^{rec}(D)/\theta_\alpha = \alpha D \qquad (3)$$

$$N_{nonrep}^{nonrec}(D)/\theta_\beta = \beta D^2 \qquad (4)$$

et

$$\frac{\alpha}{\beta} = \frac{\theta_\beta N_{nonrep}^{rec}}{\theta_\alpha N_{nonrep}^{nonrec}} = \frac{\text{CDB létales reconnues mais non}-\text{réparées}}{\text{CDB létales non}-\text{reconnues}} \text{x D} \qquad (112)$$

Ainsi, au début de mes travaux de thèse, je pouvais bénéficier d'une plate-forme technologique fonctionnelle, d'une collection de cas radiosensibles importantes et d'un modèle mécanistique qui restait à valider.

4. BUT DE LA THESE

C'est en Licence de Biologie Générale, lors d'un cours d'ouverture qui traitait de radiobiologie et d'astronomie que mon intérêt s'est porté sur les effets biologiques des radiations ionisantes. Afin d'approfondir mes connaissances en radiobiologie, j'ai réalisé plusieurs stages volontaires au sein du Groupe de Radiobiologie pour me familiariser avec les techniques de laboratoire spécifiques et les concepts nouveaux qui s'y développaient. C'est avec mes stages de Master 1 de Biologie Génétique (Grenoble 1) puis de Master de Cancérologie (Paris XI) que j'ai pu intégrer le Groupe. Au cours de ces stages, j'ai commencé la caractérisation radiobiologique de plusieurs syndromes génétiques associés à une radiosensibilité, notamment la chorée de Huntington. Le retard de transit radioinduit de la protéine ATM devenait alors une évidence expérimentale pour ce syndrome. Mon premier article sur la **Chorée de Huntington** fut en accepté en novembre 2013 (Article I) et suggérait **l'existence de protéines dites X** qui, une fois mutées, séquestreraient ATM dans le cytoplasme. **J'entrepris alors d'appliquer la même approche à la neurofibromatose de type 1 puis à la tubéreuse de Bourneville**. En parallèle, l'étude COPERNIC qui visait à caractériser les patients traités par radiothérapie et à risque de réactions tissulaires convergeait vers le même modéle. **Un lien quantitatif** se renforçait entre le retard de transit d'ATM et la radiosensibilité. C'est quelques mois plus tard que Larry Bodgi et Nicolas Foray achevèrent leur modèle mathématique décrivant ce transit, apportant pour la première fois, **une explication mécanistique concrète au modèle LQ**, base de la radiobiologie cellulaire. Enfin, une longue étude sur **les métaux et les pesticides** confirmaient également leur action possible sur la protéine ATM et conditionnant ainsi la survie cellulaire.

Ainsi, à travers mes articles présentés dans ce manuscrit nous nous sommes proposés de répondre aux objectifs scientifiques suivants:

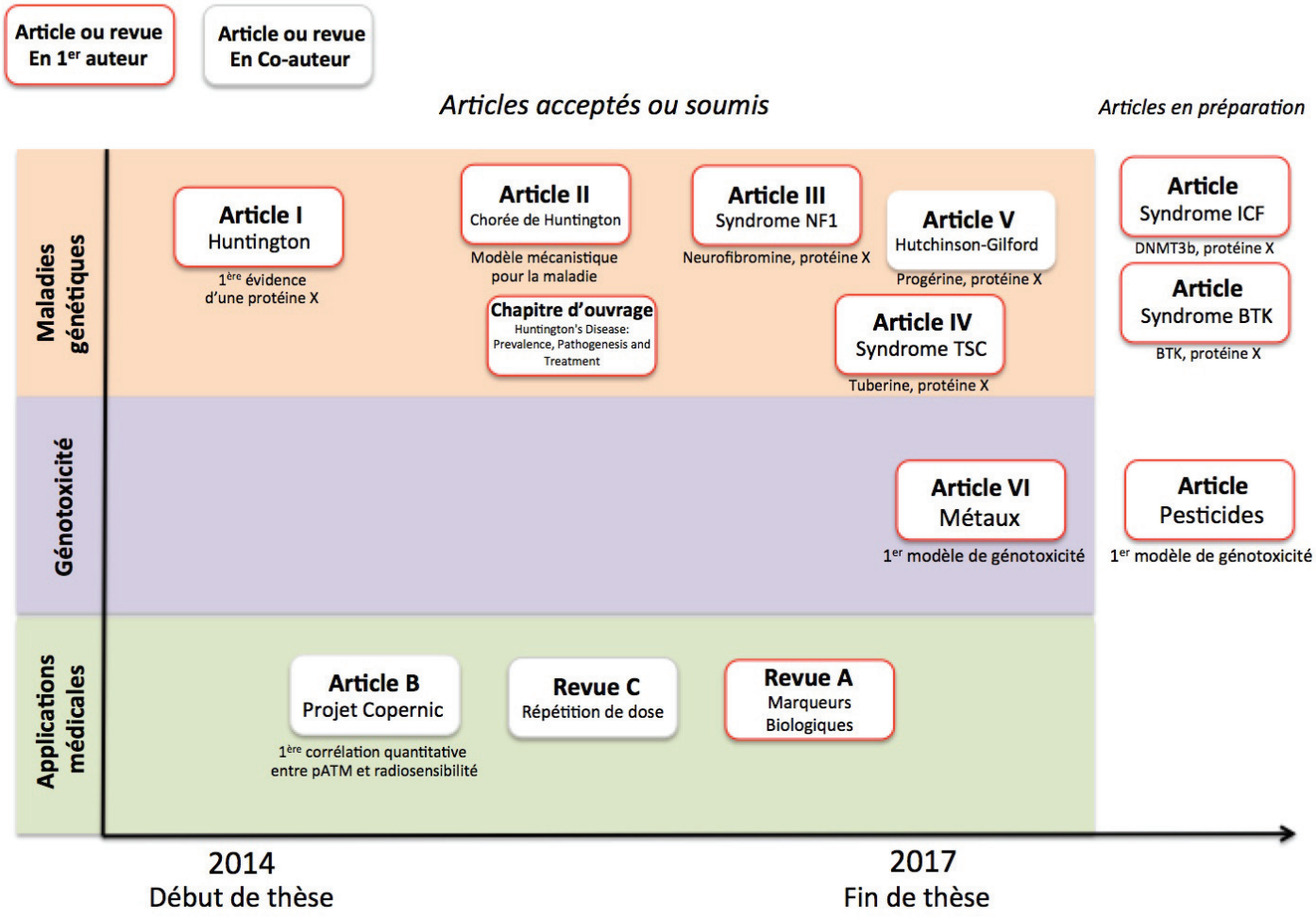
- rechercher de nouvelles protéines X tout en caractérisant de nouveaux syndromes génétiques associés à une radiosensibilité significative. C'est le cas notamment de la neurofibromatose de type I (article III), de la tubéreuse de Bourneville (article IV), du syndrome Hutchinson-Gilford (article V),

- identifier des agents non-radiatifs cassant l'ADN qui influenceraient la cinétique du transit cytonucléaire d'ATM. C'est le cas notamment des métaux (article VI) ou des pesticides (en préparation).

A l'issue de la thèse, nous avons pu répondre à la question d'ordre sémantique : comment par un seul terme les phénomènes observé ? En grec ancien, « réparation » s'écrit επισκευή et se prononce « *épiskévé* ». Nous proposons donc de définir les notions de pro- dys- et anti- épiskévie, comme toute action visant à accélérer, ralentir ou interdire le transit cytonucléaire d'ATM. On pourra citer ainsi le traitement ZOPRA comme pro-épiskévique, les protéines X comme dys-épikéviques, et les fortes concentrations de métaux et ou les fortes doses de radiation comme anti-épiskéviques.

Le but ultime de cette thèse était ainsi d'initier un tableau des agents influençant l'épiskévie. Nous avons délibérément choisi de présenter la thèse comme une thèse d'articles avec, pour chacun, un bref résumé en français. Pour respecter l'ordre chronologique ainsi qu'une certaine cohérence thématique, nous avons d'abord présenté les articles concernant la radiosensibilité d'origine génétique avant d'aborder les facteurs génotoxiques. Une conclusion générale commune à tous les articles clôture ce manuscrit. Notons que, comme les techniques sont généralement communes à tous les articles, un bref chapitre Matériels et Méthodes figure en annexe. Le lecteur plus curieux pourra trouver plus de détails dans les articles, dont une chronologie se trouve à la page suivante.

Schéma général de la thèse et des publications



5. RESULTATS

5.1 ARTICLE B : La radiosensibilité clinique et le transit d'ATM

Ce chapitre résume les données radiobiologiques et cliniques obtenues sur 117 lignées fibroblastiques (incluant 100 qui proviennent de patients dont la radiosensibilité s'est révélée en radiothérapie (collection COPERNIC)).

5.1.1 Contexte

Comme on l'a dit dans les chapitres précédents, les patients traités par radiothérapie (environ 5 à 20%) peuvent présenter des réactions tissulaires radioinduites. Ces réactions tissulaires limitent l'application du traitement planifié et augmente le taux de morbidité (305,306). Prédire les réactions tissulaires de radiosensibilité est devenu aujourd'hui un enjeu médical, scientifique, sociétal et économique. Dans un contexte particulier où les mécanismes moléculaires de la réponse aux radiations ne sont pas encore clairement définis et où il existe un certain engouement pour les tests prédictifs basés sur l'apoptose ou la génomique qui sont effectués à partir de prélèvements sanguins (voir discussion générale), nous avons adopté une démarche radicalement différente, voire à contre-courant, en privilégiant les fibroblastes par rapport aux lymphocytes, les tests fonctionnels basés sur la réparation et la signalisation des CDB plus performants et dont la corrélation avec la radiosensibilité est mieux documentée. Le but de cette étude était d'établir des liens quantitatifs entre les paramètres radiobiologiques de réparation et de signalisation des CDB d'une part et les paramètres cliniques de la toxicité radioinduite (grades CTCAE et RTOG) d'autre part. N'oublions pas que les réflexions sur la résolution du modèle LQ ont été menées quelques mois avant le dépouillement des données radiobiologiques et cliniques de la collection COPERNIC. D'ailleurs, les deux articles (celui de la résolution du modèle LQ (278) et celui que ce chapitre résume ont été publiés en même temps, en mars 2016. Nous disposions alors à la fois de la théorie du transit d'ATM bien argumentée et de son application clinique directe.

5.1.2 Résumé des résultats

La technique d'immunofluorescence γH2AX et pATM a été appliquée sur les fibroblastes irradiés à 2 Gy et incubés à 37°C 10 min, 1h, 4h et 24h après irradiation. Les nombres de micronoyaux ont également été mesurés dans les mêmes conditions. Une fois obtenues, les données radiobiologiques ont été confrontées aux grades de sévérité CTCAE ou RTOG notés par deux médecins indépendants. La mise en commun des données radiobiologiques et cliniques s'est donc effectuée de façon sans aucun *a priori* de résultats ni d'interprétation.

5.1.2.1 Taux de cassures spontanées

Aucune corrélation entre les données biologiques et cliniques n'a été obtenue avec les cellules non-irradiées, confirmant qu'aucun marqueur ne peut prédire la radiosensibilité clinique sans que l'on ait, au préalable, irradié les cellules.

5.1.2.2 Micronoyaux résiduels

Le nombre de micronoyaux résiduels, mesurés 24 h après 2 Gy a pu distinguer 3 catégories de cellules, les témoins radiorésistants (groupe I), le cas hyper-radiosensible du syndrome LIG4 (groupe IIIb) et tous les autres cas.

5.1.2.3 Les foci γH2AX résiduels

Le nombre de foci γH2AX résiduels, mesuré 24 h après 2 Gy a pu distinguer 4 catégories de cellules, les témoins radiorésistants (groupe I), le cas hyper-radiosensible du syndrome LIG4 (groupe IIIb), les cas hyper-radiosensibles du syndrome AT (groupe IIIa) et tous les autres cas, c'est-à-dire les patients groupe II. Les limites de cette dernière corrélation montrent clairement que le nombre de CDB non-réparées à 24 h pourrait ne pas prédire certains cas de radiosensibilité intermédiaire de type groupe II. Un autre marqueur est donc requis pour assurer une meilleure prédiction de la radiosensibilité (Figure 22). Cette conclusion avait déjà été dressée avec la SF2 comme paramètre de radiosensibilité, avec les données de la collection CELLINE.

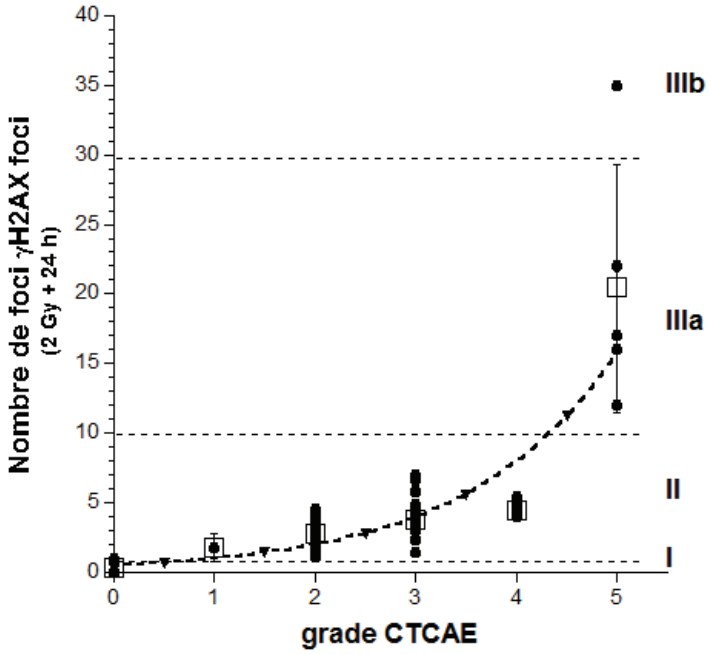


Figure 22 : *Nombre de foci γH2AX résiduels en fonction du grade CTCAE pour les lignées COPERNIC. Les carrés blancs représentent les moyennes numériques pour chaque grade. Une relation comparable a été obtenue avec les grades RTOG D'après.*

5.1.2.4 Les cinétiques γH2AX

Les cinétiques d'apparition/disparition des foci γH2AX des cellules de patients souffrant de radiosensibilité de groupe II montrent des valeurs à 10 min et à 1 h *plus basses* que celles des témoins radiorésistants, suggérant, non pas moins de CDB *induites physiquement* mais bien moins de CDB *reconnues* par phosphorylation γH2AX (Figure 23).

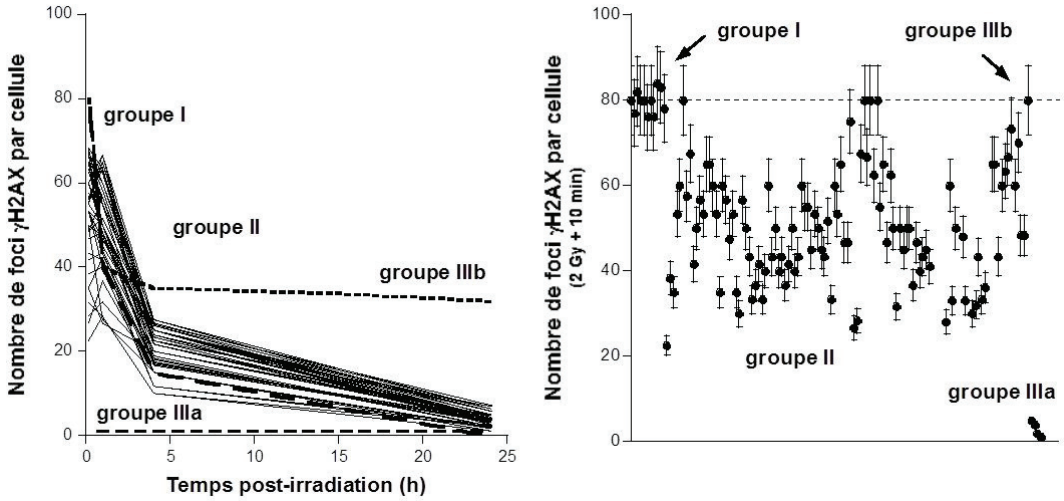


Figure 23 : *Cinétiques d'apparition/disparition de foci γH2AX en fonction du temps post-irradiation pour les lignées COPERNIC. Les barres d'erreur ont été omises. Le panneau de droite montre les points à 10 min post-irradiation pour les mêmes lignées. La ligne en pointillés repère l'incidence de 80 CDB pour 2 Gy, valeur attendue d'après la littérature.*

5.1.2.5 Les foci pATM

Puisque la phosphorylation γH2AX est ATM-dépendante, nous avons fait l'hypothèse que la protéine ATM était retardée, ce qui pourrait expliquer les taux de foci pATM plus faibles que ceux attendus. Une analyse systématique des mêmes lignées a donc été effectuée par immunofluorescence anti-pATM (Figure 24).

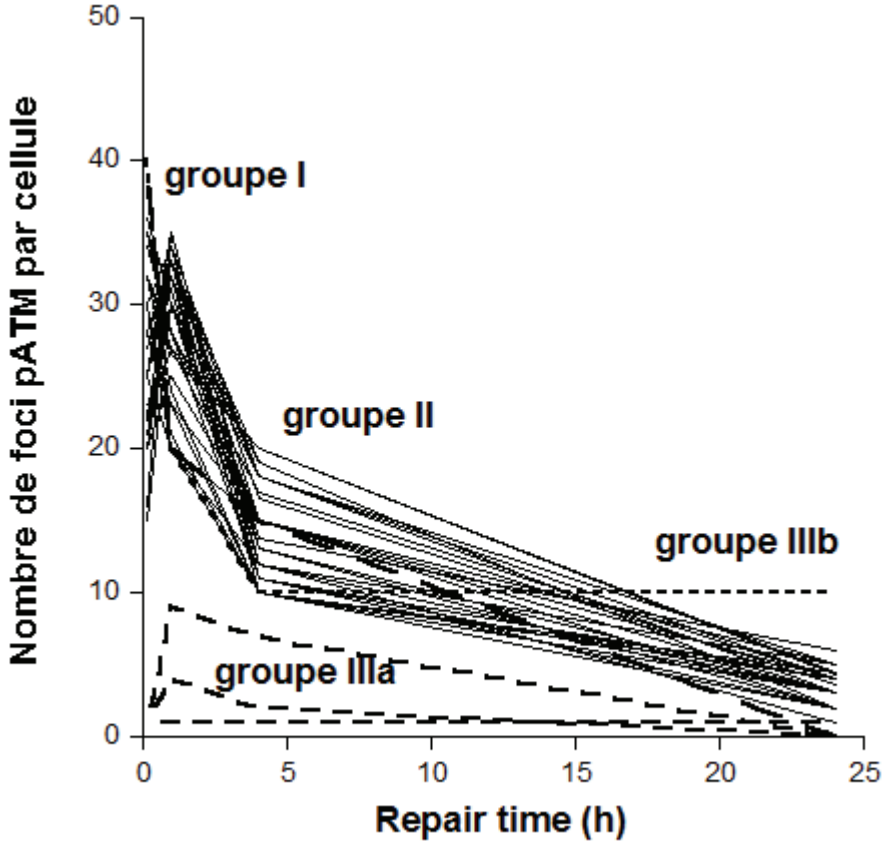


Figure 24 : *Cinétiques d'apparition/disparition de foci pATM en fonction du temps post-irradiation pour les lignées COPERNIC. Les barres d'erreur ont été omises.*

L'analyse des données a confirmé les hypothèses car :

- les immunoblots révélèrent que des formes pATM sont de plus en plus nombreuses après 10 min et 1 h dans des extraits de cellules témoins radiorésistants alors qu'elles montrent un retard systématique dans les lignées fibroblastiques du groupe II ;
- le taux de foci pATM à 10 min et/ou à 1 h était significativement plus faible que celui des témoins résistants.

5.1.2.6 Transit d'ATM dans les cellules COPERNIC

Des immunoprécipitations et des immunoblots (Western blots) ATM et pATM ont été réalisées sur des extraits cytoplasmiques, nucléaires et totaux sur les lignées COPERNIC irradiées à 2 Gy puis incubées pendant des temps de réparation de 10 min à 24 h. La difficulté était de comparer les concentrations en protéines des différents types d'extraits car la composition des solutions tampons et la

conformation des protéines n'est pas la même. Les concentrations ne sont donc ici données qu'à titre indicatif et valable pour un protocole d'extraction de protéines donné. (Figure 50). Il est à noter que :

- les quantités des formes cytoplasmiques d'ATM ou de pATM ne varient pas significativement quel que soit le temps de réparation et que les cellules soient irradiées ou non, suggérant une forte abondance de ATM dans le cytoplasme que le transit d'ATM ne diminue pas.
- les quantités des formes nucléaires de pATM varient significativement en fonction du temps post-irradiation, principalement pour les temps 10 min et 1 h (Figure 25).

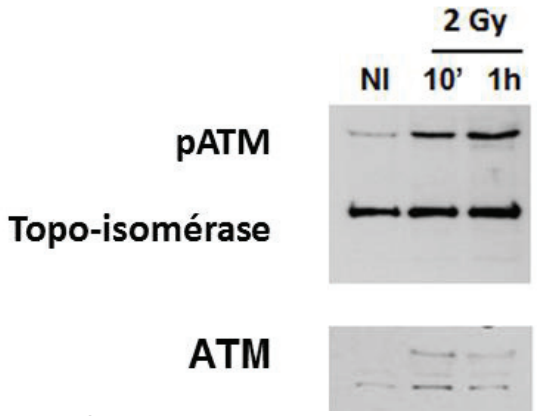


Figure 25: Exemple représentatif d'*immunoblots pATM et ATM sur des extraits nucléaires d'une lignée COPERNIC de groupe II. On observe que la quantité de pATM dans le noyau mesurée sur des cellules non-irradiées (NI) augmente après irradiation.*

5.1.2.7 Corrélation entre pATMmax et grade CTCAE

Nous avons ensuite recherché des corrélations quantitatives entre les grades de sévérité CTCAE ou RTOG et les données pATM obtenues à 10 min ou bien à 1 h post-irradiation. Les corrélations ne furent pas satisfaisantes. Par contre, nous nous aperçûmes que certaines lignées montraient un nombre de foci maximal à 10 min ou bien à 1 h comme l'illustre bien la figure 24. Le nombre de foci pATM reflétant logiquement l'activité kinase dans le noyau, nous avons fait l'hypothèse que le maximum du nombre de foci pATM entre les données 10 min et 1 h (pATMmax) refléterait donc l'activité kinase d'ATM dans le noyau. La corrélation entre pATMmax et les grades de sévérité CTCAE et RTOG apparut significative et discrimina alors 5 catégories de cellules : groupe I, groupe II, groupe IIIa, groupe IIIb (ANOVA $p<0.0001$). Evidemment, nous invitons le lecteur à lire l'article B pour plus de détails (Figure 26).

Les notions de sensibilité et spécificité n'étaient pas applicables ici car le nombre de catégories (grades de sévérité) est supérieur à 2. La méthode des dispersions a donc été utilisée. La concordance et la discordance, équivalent ici de sensibilité et spécificité furent respectivement de 85.5% et 14.5%. Afin de vérifier si les relations entre pATMmax et les grades CTCAE et RTOG étaient dépendantes de la localisation tumorale, nous avons vérifié la significativité de cette relation en réduisant l'analyse aux patients souffrant de tumeurs au sein, de prostate, du système nerveux de l'enfant ou du système oto-rhino-laryngologique pédiatriques. Pour chacune de ces sous-classes, la corrélation apparut significative et caractérisée par les mêmes paramètres numériques. Nous avons fait de même pour les réactions précoces et tardives et, là encore, la même corrélation quantitative resta valable.

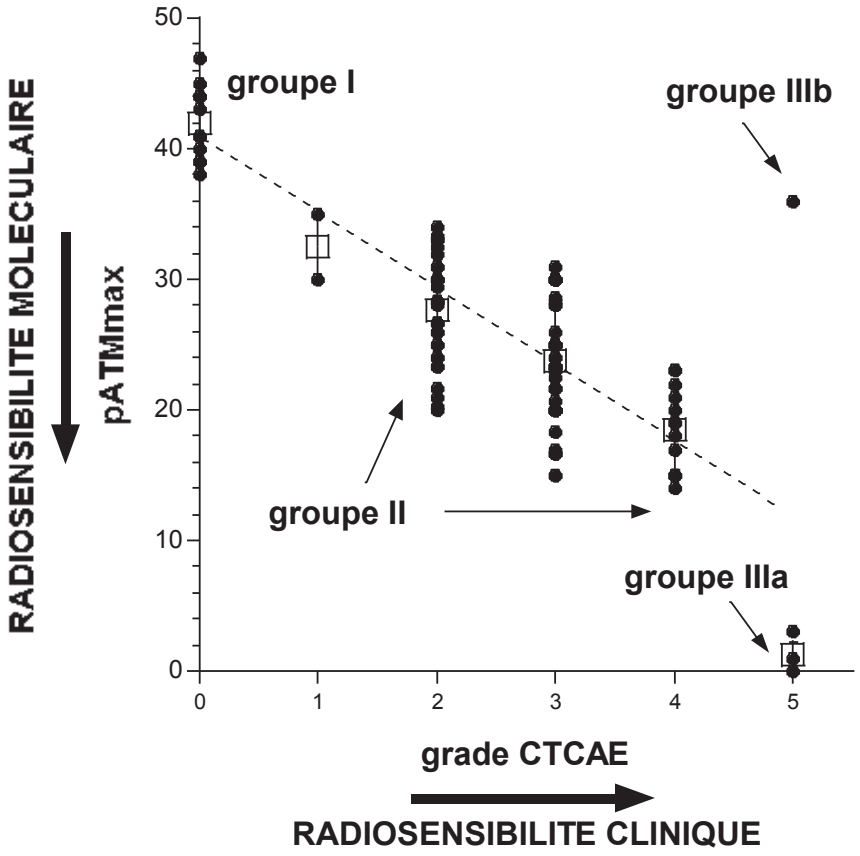


Figure 26 : *Relation entre pATMmax et le grade CTCAE pour les lignées COPERNIC. Les carrés blancs représentent les moyennes numériques pour chaque grade. On remarquera que la relation linéaire affine existant entre pATMmax et le grade CTCAE suggère que le tableau clinique correspondant à un décès (hyper-radiosensibilité de groupe III)*

arbitrairement fixé à un grade 5 pourrait être fixé à un grade supérieur (7 par exemple). Notons que la lignée 180BR (LIG4$^{-/-}$), seul cas mondial de groupe IIIb n'obéit pas à la relation mais est aisément détectable par le nombre de foci γH2AX résiduels ou le taux de mironoyaux résiduels (voir plus loin). La même relation mathématique a été obtenue avec les grades RTOG.

5.1.2.8 Relation entre γH2AX et pATM

Placées ensemble sur la même courbe, les données γH2AX et pATM ont décrit des aires de confiance, ou plutôt des « domaines des possibles » pour définir les groupes de radiosensibilité (Figure 27).

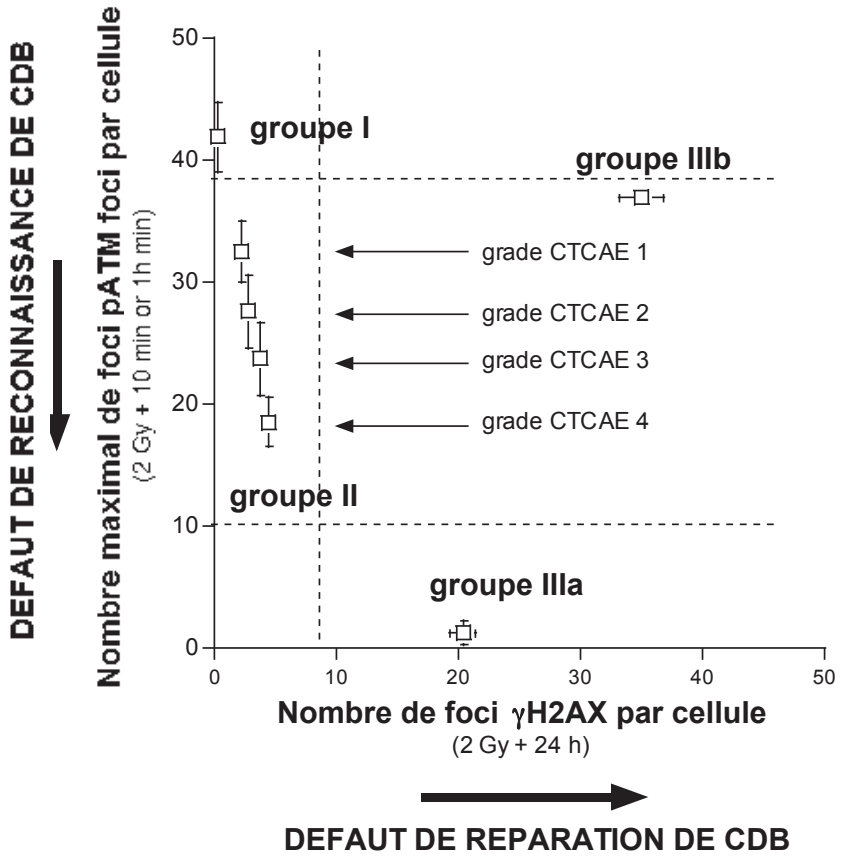


Figure 27 : *Relation entre pATMmax et le nombre de foci γH2AX résiduels pour les lignées COPERNIC. Les carrés blancs représentent les mêmes valeurs que celles représentées dans la figure 51. Les lignées en pointillés délimitent les valeurs numériques des paramètres pour définir les groupes de radiosensibilité.*

Par exemple, pour faire partie du groupe I (radiorésistants), les contraintes sont très fortes puisqu'il faut avoir à la fois une reconnaissance des CDB maximale et une

réparation complète. A l'inverse, dès un taux de 8 CDB non réparées à 24 h, on se trouve dans le groupe III. Des défauts de reconnaissance des CDB comme ceux observés dans les cellules provenant de patients AT. De même, il ne peut y avoir de lignées radiosensibles avec une réparation normale mais une reconnaissance défectueuse, ce qui renforce encore l'importance du transit d'ATM qui assure la reconnaissance des CDB, condition nécessaire (mais pas suffisante) pour la réparation (Figure 27).

5.1.3 Discussion

Le but de cet article était d'établir un lien quantitatif entre les paramètres radiobiologiques et les données cliniques que sont les grades CTCAE ou RTOG. La corrélation obtenue avec pATMmax fut établie quelle que soit la localisation tumorale et quelle que soit la nature précoce ou tardive de la réaction tissulaire. Une nouveauté importante résida dans le fait que les grades de sévérité furent ici prédits de façon séparée contrairement aux études existantes qui réunissaient en 2 catégories les grades 0+1+2 et les grades 3+4 ou 0+1 et 2+3+4 (ex : (307-309)). D'ailleurs jamais le grade 5 n'avait été intégré dans ces études, pourtant gage d'une certaine cohérence clinique. Notons que toute catégorisation en 2 sous-populations de grade introduit de fait un biais important dans la description de la radiosensibilité qui, comme on l'a vu plus haut n'est jamais un phénomène de « tout-ou-rien ». C'est également la première fois qu'une relation intègre à la fois la morbidité (grades 1, 2, 3, 4) et la mortalité (grade 5). Nos données confirment l'importance du transit cyto-nucléaire d'ATM. D'ailleurs, l'existence de formes pATM cytoplasmiques est validée désormais dans 117 lignées cellulaires, ce qui en fait une preuve incontestable des hypothèses de travail que nous avions émises.

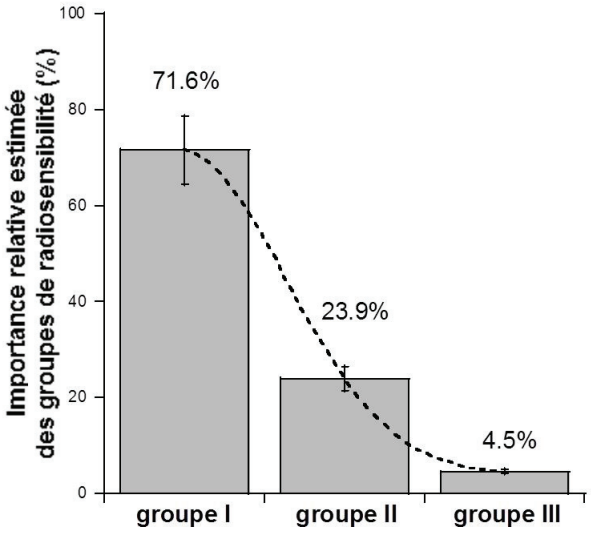


Figure 28 : *Incidence estimée des groupes de radiosensibilité estimée à partir des données de la figure 27.*

5.1.4 Conclusions et perspectives

Une des conclusions majeures de cet article est la définition d'une classification générale de la radiosensibilité humaine sur des bases scientifiques, cliniques et quantifiées. On peut ainsi faire la distinction entre l'hyper-radiosensibilité des patients groupe III, souffrant soit d'un défaut massif de réparation des CDB ou un défaut massif de leur signalisation et la radiosensibilité modérée des patients groupe II, marquée par un retard significatif du transit d'ATM. Grâce à ces données, peut-on estimer l'importance relative de chacun des groupes de radiosensibilité ? A partir de la figure 52 qui définit les contraintes de reconnaissance et de réparation des CDB sous la forme de « surfaces des possibles ». Considérant que le nombre de foci γH2AX résiduels et pATMmax varient de 0 à 50 et l'équiprobabilité des événements biologiques, l'inverse des surfaces occupé par chaque groupe définit son incidence. La figure 33 montre une estimation semi-gaussienne de l'importance relative des groupes : on y retrouve le continuum des réponses, l'aspect attendu évoqué dans la figure 29 et la prédominance de la sous-population radiorésistante.

5.2 ARTICLE I : La maladie de Huntington et le transit d'ATM

Ce chapitre résume l'article I et concerne la maladie de Huntington (MH) qui a été l'objet des toutes premières applications de notre théorie. Lors de la rédaction de ce manuscrit, un commentaire d'article (Article II) ainsi qu'un chapitre dans un ouvrage (se trouvant en annexe) ont été publié par notre groupe et consolide la pertinence de notre modèle d'explication pour la MH.

5.2.1 Contexte

La maladie de Huntington (MH), est une maladie génétique, dominante, neurodégénérative affectant les neurones du noyau caudé, du *putamen* et plus tardivement du cortex cérébral. Observée pour la première fois en 1872 par le docteur George Huntington, elle porte aussi le nom de chorée en raison de ses symptômes les plus visibles que sont les mouvements anormaux caractéristiques de la maladie (294). Les manifestations cliniques apparaissent normalement après l'âge de 30 ans sous forme de changements de la personnalité, de troubles cognitifs et moteurs suivis par la mort (295). Cette maladie est causée par la mutation du gène IT15 codant pour une protéine de 3144 acides aminés, la huntingtine (Htt, 350 kDa) (296,297). La protéine possède un domaine poly-glutaminique (polyQ) qui s'allonge suivant les mutations. A partir de 41 répétitions de ces triplets on observe une pénétrance totale de la maladie de Huntington, entre 35 et 41 la pénétrance est partielle. Quand il y a moins de 35 répétitions, la maladie ne se déclare pas (296,297).

Certaines études avaient déjà évoquées l'impact de la protéine huntingtine dans la réparation des dommages de bases mais son rôle exact dans la reconnaissance et la réparation des autres dommages de l'ADN restait inconnu (298,299). Dans les années 80, plusieurs groupes de recherche ont montré que les cellules des patients souffrant de la MH sont radiosensibles (300-304). En 1996, une étude a classé cette maladie parmi les 10 syndromes génétiques associés à une radiosensibilité significative (287). Pourtant, la MH est causée par des mutations d'une protéine, la huntingtine, considérée comme uniquement cytoplasmique. Jusqu'à aujourd'hui, il n'existait pas de modèle mécanistique expliquant l'action de cette protéine et encore moins sa radiosensibilité.

5.2.2 Résumé des résultats

Le but de l'étude publiée en 2014 était de vérifier si la mutation de la huntingtine est associée à un retard du transit cyto-nucléaire de la protéine ATM. Dans cet article, nous avons examiné les modes de signalisation et de réparation ATM-dépendants des CDB radioinduites sur des fibroblastes provenant de patients souffrants de la maladie de Huntington.

5.2.2.1 Localisation de la huntingtine

Afin de vérifier la localisation cytoplasmique de la huntingtine, plusieurs anticorps contre la HTT ont été testés sur des lignées témoins ou MH. En particulier, nous avons vérifié, avant comme après irradiation, que la huntingtine était majoritairement cytoplasmique. La figure 29 montre des données conforme à la littérature et illustre également que même pour les cellules mutées pour la huntingtine (MH), la protéine HTT est exprimée sans que l'intensité du signal soit réduite par rapport à la lignée témoin. Cet exemple illustre bien le fait que la mutation hétérozygote de la huntingtine protéine peut ne pas entraîner une baisse d'expression.

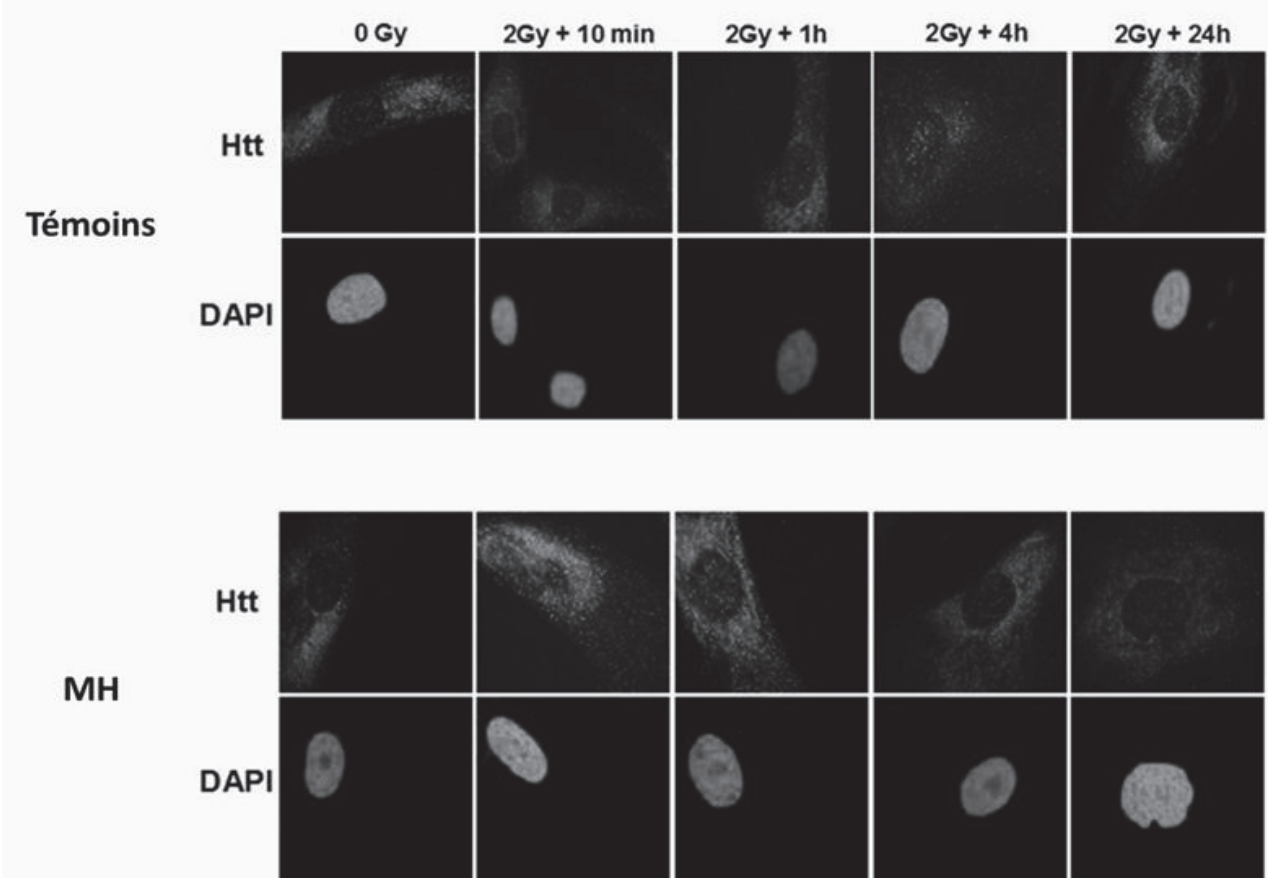


Figure 29 : *Exemples de localisation de la huntingtine (Htt) sur des lignées radiorésistante (155BR) ou mutée (MH) (GM21757), observée par immunofluorescence dans des conditions d'irradiation différentes. La contre-coloration au 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) indique l'emplacement du noyau.*

5.2.2.2 Données de survie

La survie clonogénique a été obtenue sur deux lignées fibroblastiques provenant de patients souffrant de la MH, MH, GM21756 et GM21757. Après ajustement des données de survie avec le modèle LQ, on obtient les valeurs suivantes des paramètres : $\alpha = 0.405 \pm 0.02 Gy^{-1}$ et $\beta = 0.038 \pm 0.01\ Gy^{-2}$ (Figure 30). Ces données montrent que les lignées testées sont caractérisées par une radiosensibilité intermédiaire comparables à celle observée pour les syndromes de Cockayne ou de Xeroderma Pigmentosum (287).

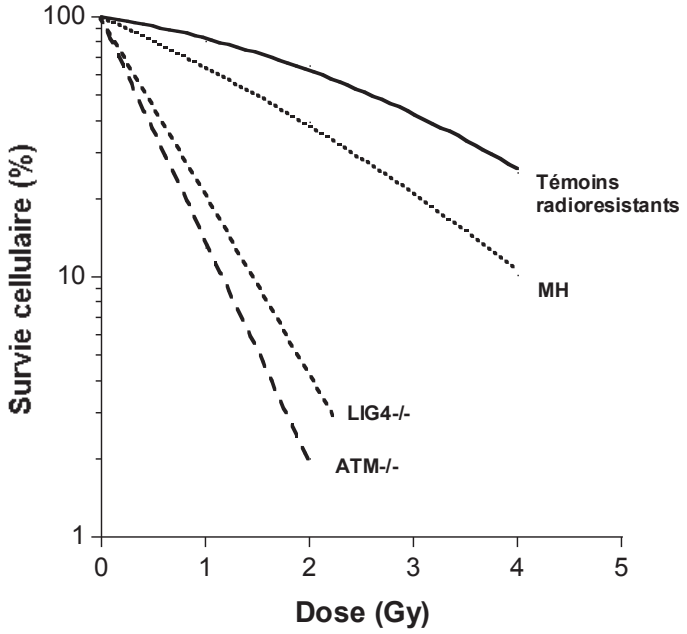


Figure 30 : *Ajustements des courbes de survie des lignées fibroblastiques les plus représentatives (155BR, lignée témoin radiorésistante ; AT5BI, lignée ATM$^{-/-}$; 180BR, lignée LIG4$^{-/-}$) ainsi que celle de la lignée GM21757 (lignée MH).*

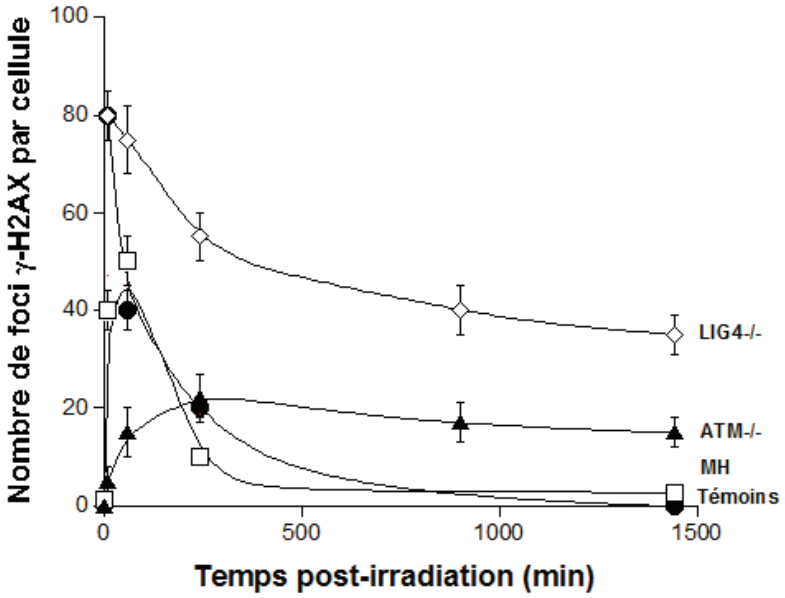


Figure 31 : *Cinétique d'apparition/disparition des foci γH2AX après 2 Gy pour différentes lignées fibroblastiques incluant GM21757 (MH).*

5.2.2.3 Données γH2AX

Pour la lignée radiorésistante 155BR, la cinétique des foci γH2AX a montré un taux de CDB 10 min après 2 Gy de 80 ± 2 foci, correspondant à une induction de CDB de 40 ± 4 par Gy par cellule. On a noté l'absence de foci γH2AX à 24 h post-irradiation (0 ± 1). Ces données indiquaient une réparation complète des CDB reconnues par la réparation par suture. Ces données étaient en accord avec celles déjà publiées. Dix min après irradiation, les 2 lignées des patients, GM21757 et GM21756, montraient un nombre de foci significativement inférieur à celui de la lignée témoin (46 ± 6 foci γH2AX par cellule) suggérant un défaut de reconnaissance des CDB. Après 24 h, un nombre de CDB résiduelles suggérait un défaut de réparation (pour GM21756: 2.8 ± 0.15; pour GM21757 : 3 ± 0.14 foci γH2AX par cellule) (Figure 31).

5.2.2.4 Données pATM

Dans les cellules témoins 155BR, une exposition à 2 Gy a conduit à un transit rapide de pATM et à la formation d'environ 40 foci nucléaires après 10 min. Ce nombre a diminué progressivement pour atteindre 5.4 ± 2 foci pATM par cellule 24 h post-irradiation. Un retard dans le transit d'ATM vers le noyau a été observé dans les lignées GM21757 et GM21756 (GM21757: 23 ± 7; GM21756: 0 ± 3 foci pATM par

cellule). Tous ces résultats suggéraient un retard du transit cyto-nucléaire de la protéine d'ATM pour les cellules mutées pour la huntingtine (Figure 32).

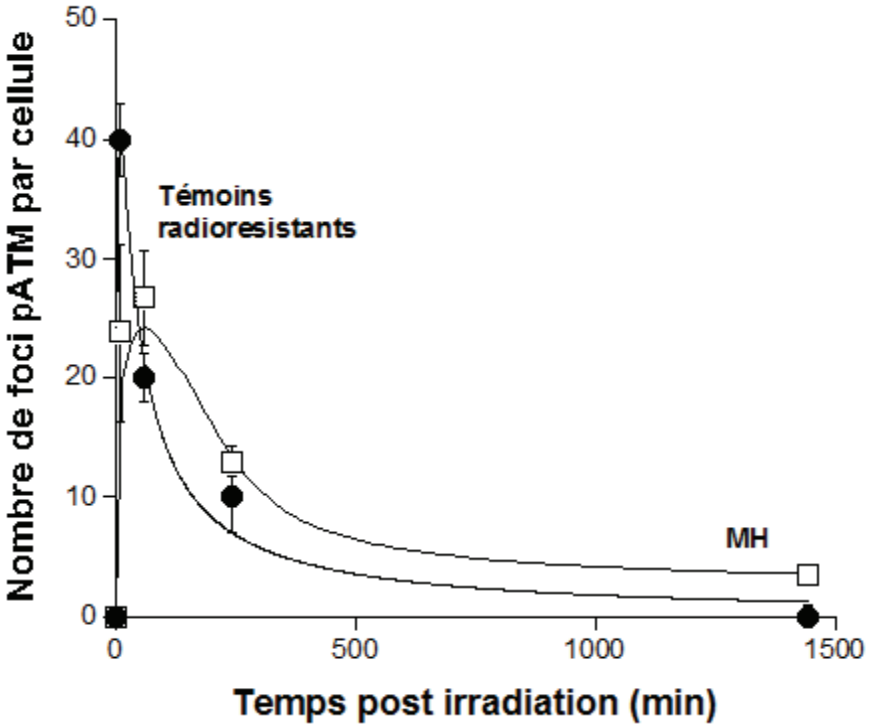


Figure 32 : *Cinétique d'apparition/disparition des foci pATM après 2 Gy pour la lignée GM21757 (MH) et la lignée 155BR, témoin radiorésistant.*

5.2.2.5 Données avec les statines et les biphosphonates

L'observation que la combinaison d'une statine (pravastatine) et d'un biphosphonate (zoledronate) (traitement ZOPRA) inhibe la farnésylation des membranes nucléaires et aboutit notamment à une accélération du transit cyto-nucléaire d'ATM avait déjà été observée pour la progéria (227). Nous avons donc entrepris d'appliquer le traitement ZOPRA aux cellules MH pour vérifier si la modulation du transit d'ATM modifiait les cinétiques des foci γH2AX et pATM (Figure 33).

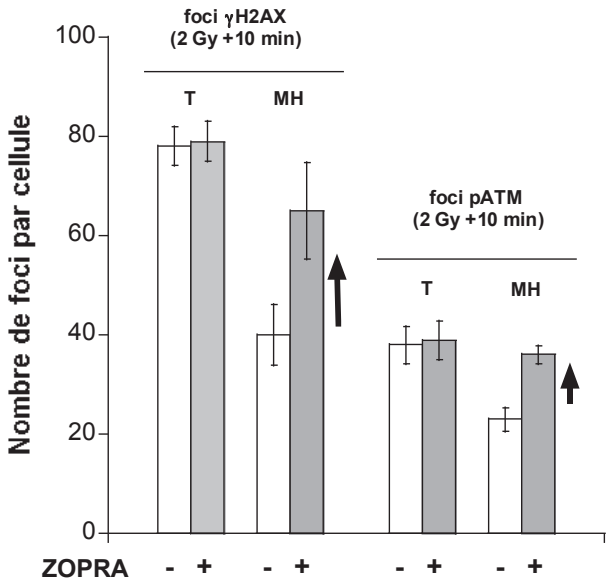


Figure 33 : *Nombre de foci γH2AX et pATM après 2 Gy et 10 min post-irradiation sur des lignées fibroblastiques traitées ou non par ZOPRA. Les lignées testées sont 155BR (témoin radiorésistant (T)) et la lignée GM21757 (MH).*

En ce qui concerne l'étude sur la MH, le traitement ZOPRA n'affecta pas la cinétique d'apparition des foci γH2AX dans la lignée radiorésistante. Par contre, les cellules GM21756 et GM21757 traitées au ZOPRA montrèrent un nombre de foci γH2AX après 10 min comparable à ceux observés dans les témoins. Si le traitement ZOPRA ne modifia pas la cinétique d'apparition des foci pATM dans la lignée témoin, il rétablit significativement le transit de pATM vers le noyau dans les deux lignées cellulaires de patient atteint par la MH (Figure 33). Cette restauration du transit cyto-nucléaire d'ATM permettrait la phosphorylation précoce de H2AX après irradiation et augmenterait donc d'une part, la reconnaissance des CDB et d'autre part leur réparation par suture. Pour la première fois, nous obtenions avec les données de survie, de γH2AX et de pATM, un des exemples concrets d'un modèle de transit d'ATM qui régulerait la radiosensibilité. Toutefois, il fallait encore s'abstraire des possibles artéfacts techniques comme la non-spécificité de certains anticorps appliqués avec la technique d'immunofluorescence.

5.2.2.6 La huntingtine, protéine partenaire d'ATM

Afin de vérifier le rôle que joue la huntingtine mutée dans le retard du transit cyto-nucléaire de la protéine ATM, des expériences d'immunoprécipitation d'ATM et de pATM furent entreprises (Figure 34). Les quantités globales d'ATM apparurent comparables dans les trois lignées testées. Par contre, la huntingtine ne s'associait à ATM que dans les lignées MH et pas dans la lignée témoin. Ce résultat indiquait alors que :

- ATM s'associe seulement et spontanément aux formes mutées de la huntingtine
- Comme des extraits totaux ont été utilisés et que la huntingtine, (sous sa forme mutée ou non) ne s'exprime que dans le cytoplasme, l'association ATM-huntingtine devrait ne s'effectuer que dans le cytoplasme des lignées MH.

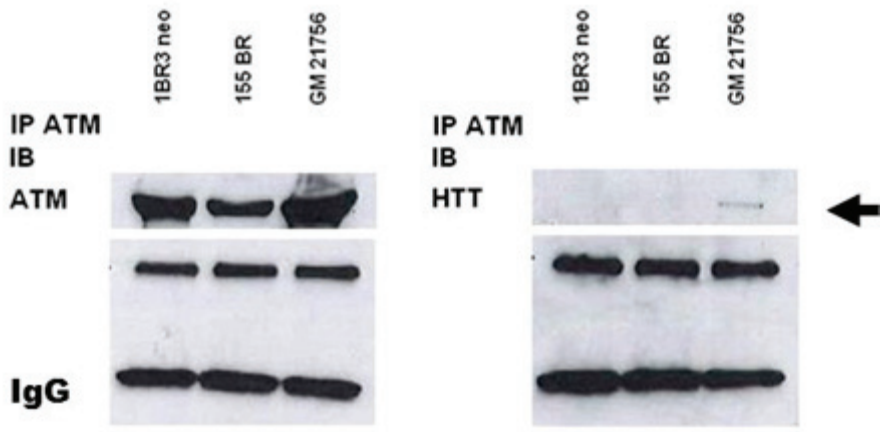


Figure 34 : *Immunoprécipitations d'extraits cellulaires de lignées radiorésistantes (transformée 1BR3Neo, ou non-transformée, 155 BR) et MH (GM21756) avec des anticorps contre ATM ou HTT suivis d'immunoblots croisés. La présence des immunoglobulines G (IgG) sert de témoins de charge. La présence de formes liées à HTT est indiquée par une flèche.*

5.2.3 Discussion

Dans cette étude, nous avions analysé les modes de signalisation et de réparation ATM-dépendants des CDB radioinduites de fibroblastes provenant de patients souffrants de la MH. Aux temps post-irradiation précoces, les cellules quiescentes ont montré un rythme de reconnaissance des CDB anormalement lent, reflété par un

faible nombre de foci γH2AX. De plus, le nombre de CDB non réparées 24h après irradiation était également significatif. Les cellules de patients atteints de la MH ont aussi montré un retard du transit cyto-nucléaire de la protéine d'ATM, suggérant ainsi qu'une forme sauvage de la huntingtine est nécessaire pour une activité normale de la kinase ATM dans le noyau. Comme la huntingtine est une protéine cytoplasmique, les défauts de reconnaissance et de réparation des CDB ne peuvent donc pas être un résultat direct de l'action de la huntingtine dans le noyau. Notre modèle du transit d'ATM apporte donc ici une réponse logique et cohérente aux questions posées par la radiosensibilité de la MH. Nos résultats suggèrent donc ici que l'association entre ATM et la huntingtine dans le cytoplasme pourrait ralentir le transit d'ATM dans le noyau, induisant ainsi des défauts de reconnaissance et de réparation des CDB.

5.2.4 Conclusion et perspectives

Nous avons trouvé dans la caractérisation radiobiologique de la MH une application directe à notre modèle de transit d'ATM et, inversement, notre modèle a permis de préciser le rôle moléculaire de la huntingtine. Des études ont montré que la protéine ATM est une protéine assez faiblement exprimée dans les cellules neuronales. Il serait donc possible que les défauts observés dans les fibroblastes de MH soient aggravés au niveau cérébral : nos résultats seraient ainsi compatibles avec le fait que la séquestration d'ATM par la huntingtine mutée contribuerait à une certaine neurodégénération, celle-ci étant causée par la non-réparation de dommages de l'ADN que la protéine ATM aurait contribué à réparer. Notre modèle de transit d'ATM pour expliquer le rôle de la huntingtine est d'autant plus cohérent que l'on peut aussi imaginer que *plus le domaine polyQ est long (comme dans les cas les plus sévères de la MH), plus la protéine ATM peut être piégée.* Enfin, le fait que le ZOPRA corrige le retard de transit d'ATM en fait un outil intéressant à tester pour ralentir l'évolution de la maladie. Ce modèle se distingue donc des hypothèses actuelles concernant l'épigénétique et le méthylome ou encore la signalisation d'autres dommages que les CDB, hypothèses qui ne peuvent expliquer la radiosensibilité liée à la MH (298) (Figure 35).

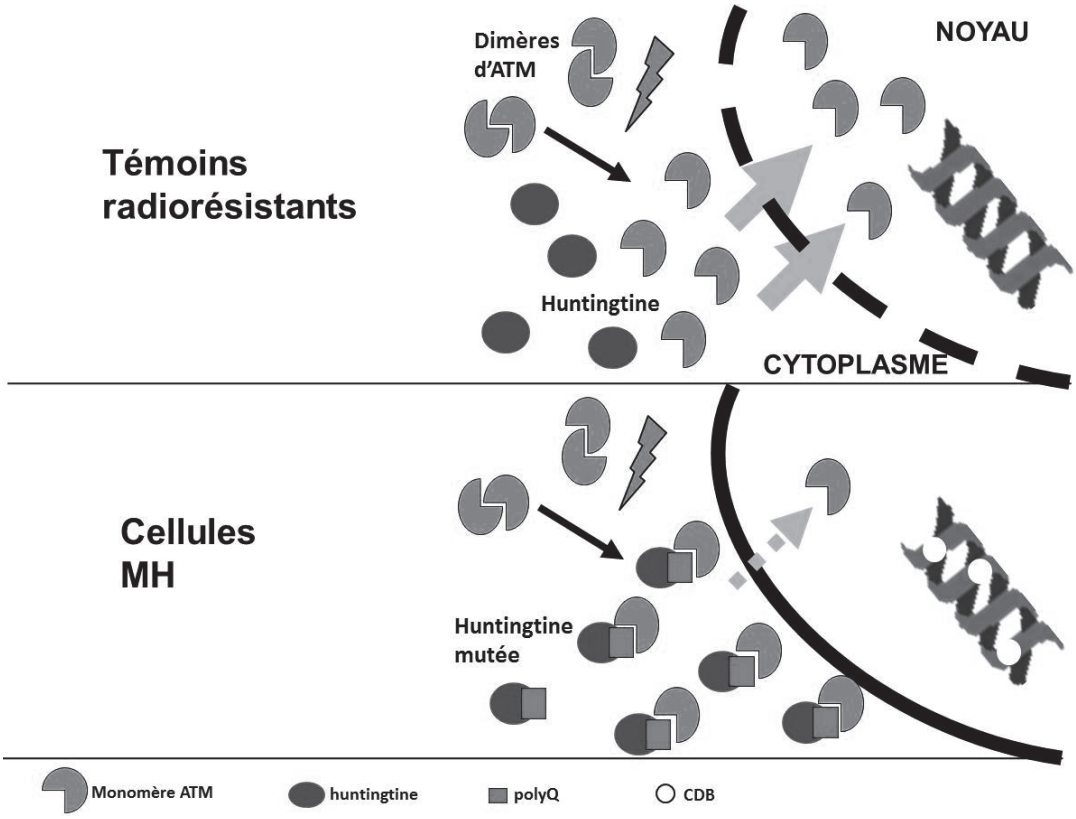


Figure 35 : *Modèle du transit d'ATM appliquée à la MH. Pour des lignées témoins radiorésistantes, l'irradiation produit la monomérisation d'ATM dans le cytoplasme et les monomères diffusent dans le noyau et participent à la reconnaissance des CDB. Dans ce cas, la huntingtine, non-partenaire d'ATM, ne gêne pas le processus. A l'inverse, dans le cas des cellules MH, le polyQ de la huntingtine mutée interagit avec ATM, formant ainsi un complexe ATM-HTT qui ralentit le processus de diffusion transmembranaire d'ATM. Ainsi, la mutation de la huntingtine ralentit la reconnaissance des CDB et leur réparation. L'application du traitement ZOPRA aux cellules MH pourrait corriger ce ralentissement en facilitant le transit d'ATM en perméabilisant la membrane nucléaire et/ou dissociant les complexes ATM-HTT.*

5.3 ARTICLE III : La neurofibromatose de type 1 et le transit d'ATM

Ce chapitre résume les travaux effectués sur la neurofibromatose de type 1 (NF1). Cet article présente la réponse aux radiations de 4 patients atteints de NF1.

5.3.1 Contexte

La neurofibromatose de type 1 est une maladie autosomique dominante qui fut décrite par Friedrich Daniel Von Recklinghausen. Sa prévalence est de 1/3000 et sa pénétrance est de 100% à l'âge de 5 ans. La NF1 est un syndrome de prédisposition au cancer associé à la formation de tumeurs bénignes ou malignes le long des nerfs périphériques et optiques. Cette maladie est causée une mutation hétérozygote du gène NF1 codant pour la neurofibromine (NF), une protéine de 2818 acides aminés. Cette protéine est un suppresseur de tumeur via l'inhibition de la voie Ras. La physiopathologie des neurofibromatoses est définie par une prolifération non régulée des cellules de Schwann. Souvent bénignes mais à risque de transformation spontanée élevée, ces proliférations causent un effet de masse sur les organes avoisinants et sont à l'origine de la majorité des complications sur ce terrain. Des séquelles peuvent apparaître tardivement chez une minorité de patients NF1 irradiés sur l'encéphale pour divers niveaux de dose.

En 1996 une étude a classé cette maladie parmi les 10 syndromes génétiques associée à une radiosensibilité significative. Pourtant, la NF1 est causée par des mutations d'une protéine, la neurofibromine, considérée comme uniquement cytoplasmique. Cet article est le premier modèle mécanistique expliquant l'action de la neurofibromine dans le cadre de la radiosensibilité observée chez les patients atteint de NF1.

5.3.2 Résumé des résultats

Le but de l'étude était de vérifier si la mutation de la neurofibromine est associée à un retard du transit de la protéine ATM vers le noyau après irradiation. Dans cet article nous avons observé la voie de réparation ATM-dépendante des CDB radioinduites en utilisant pour modèle cellulaire des fibroblastes de peau de patients atteint de neurofibromatose de type 1.

5.3.2.1 Localisation de la neurofibromine

La localisation de la neurofibromine a été testée par immunofluorescence. Ainsi, dans toutes les lignées NF1 et témoins, le marquage est essentiellement cytoplasmique. Une localisation cytoplasmique mais aussi nucléaire de la neurofibromine est observée dans des lignées hyper-radiosensibles mutées pour ATM ou pour l'un de ses substrats, NBS1 conduisant à supposer qu'une dysfonction des voie ATM ou NBS1 pourraient perturber l'expression et la localisation de la NF (Figure 36 A). À des doses non pertinentes en clinique (15 Gy), il semblerai que la localisation de la NF soit nucléaire mettant en évidence un possible transfert vers le noyau à ces doses (Figure 36 B). Enfin, des expériences de westernblots sur des extraits cytoplasmiques montrent que les cellules de patients NF1 expriment la neurofibromine de manière plus conséquente que les cellules témoins (figure 36 C).

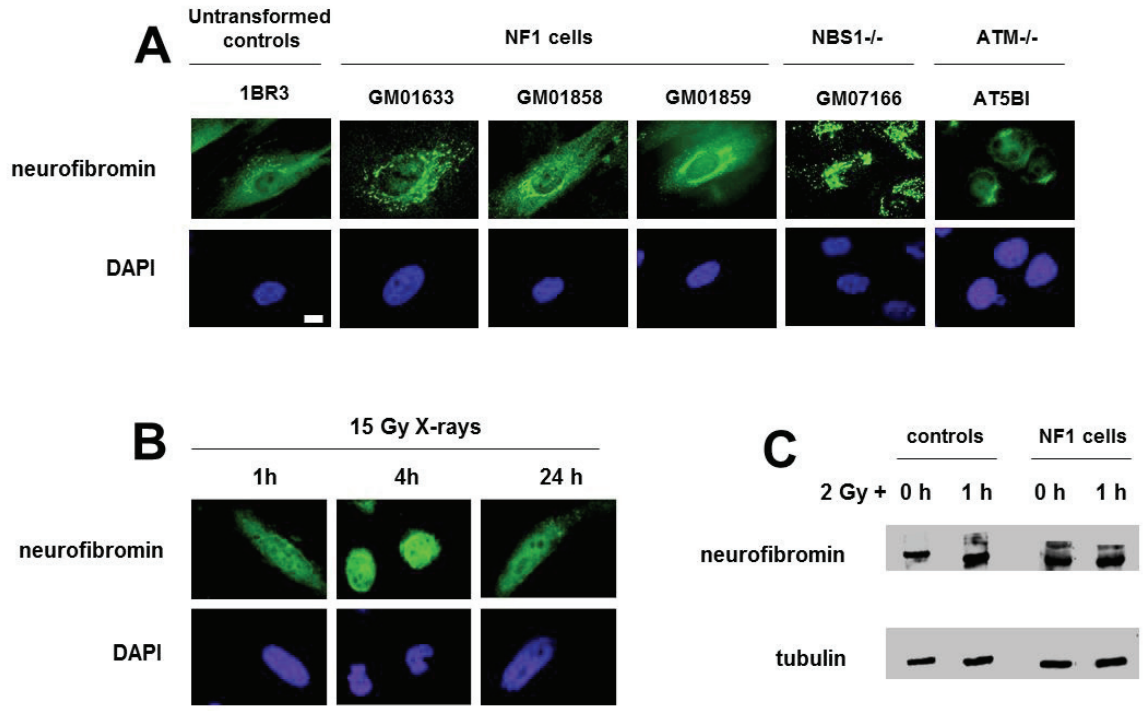


Figure 36 : A et B : *Exemples de localisation de la neurofibromine sur des lignées radiorésistantes (155BR) ou mutées (NF1), observée par immunofluorescence dans des conditions d'irradiation différentes. La contre-coloration au 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) indique l'emplacement du noyau.* ***C :*** *Visualisation de la localisation de la NF par westernblot d'extraits cytoplasmiques de cellules témoins ou NF1. La tubuline sert de contrôle de charge.*

5.3.2.2 Données γH2AX

Dans nos conditions, le nombre de foci γH2AX spontanés observés en immunofluorescence est comparable entre les témoins et les cellules. Nous avons ensuite procédé à l'étude de la cinétique de réparation des CDB de 0 à 24h après irradiation à 2 Gy (Figure 37A). Dans la lignée témoin, on observe 10min après irradiation 80 ± 5 par cellules. Pour les cellules NF1 ce nombre est systématiquement inférieur (70 ± 5 γH2AX foci par cellule en moyenne, $p<0.06$). Les fibroblastes NF1 montrent un plus grand nombre de foci γH2AX persistants 24h après irradiation (GM01633: 6.1 ± 2.1; GM01858: 8.4 ± 1.43, GM01859: 4.8 ± 1.2 γH2AX foci par cellule) par rapport aux témoins 1BR3 (0.8 ± 0.4 γH2AX foci par cellule). Cette différence suggère une vitesse de réparation plus lente chez les cellules NF1 (Figure 37). Toutefois, les foci γH2AX résiduels observés chez les patients NF1 24h après irradiations sont moins nombreux que chez les patients hyper-radiosensibles mutés dans la protéine ATM (lignée AT5BIVA) ou Ligase IV (lignée 180BR), suggérant une radiosensibilité signifiante mais modérée des patients atteint de NF1 (Figure 37).

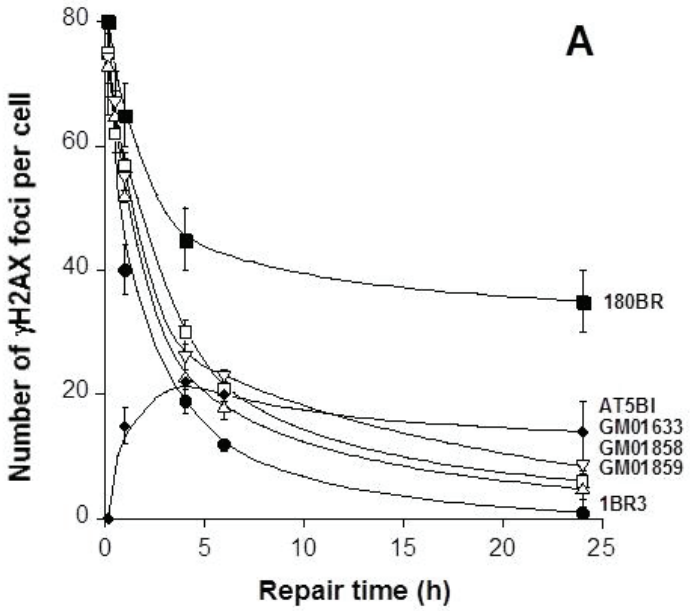


Figure 37 : *Cinétique d'apparition/disparition des foci γH2AX après 2 Gy pour différentes lignées fibroblastiques incluant les lignées NF1.*

5.3.2.3 Données pATM

Dans les cellules témoins 1BR3, une exposition à 2 Gy conduit à un transit rapide de pATM et à la formation d'environ 40 foci nucléaires après 10 min. Ce nombre diminue progressivement pour atteindre 2.7 ± 1.4 foci pATM par cellule 24 h post-irradiation. Un retard dans le transit d'ATM vers le noyau est observé dans les lignées NF1 (GM01633: 1.5 ± 1.5; GM01858: 25 ± 5; GM01859: 15 ± 6 and 1BR3: 43.8 ± 8; $p<0.01$ foci pATM par cellule) ainsi qu'une différence dans la cinétique d'apparition et disparition des foci pATM, suggérant que la mutation causée par la NF1 entraine une dérégulation de l'activité de la kinase ATM (Figure 38)

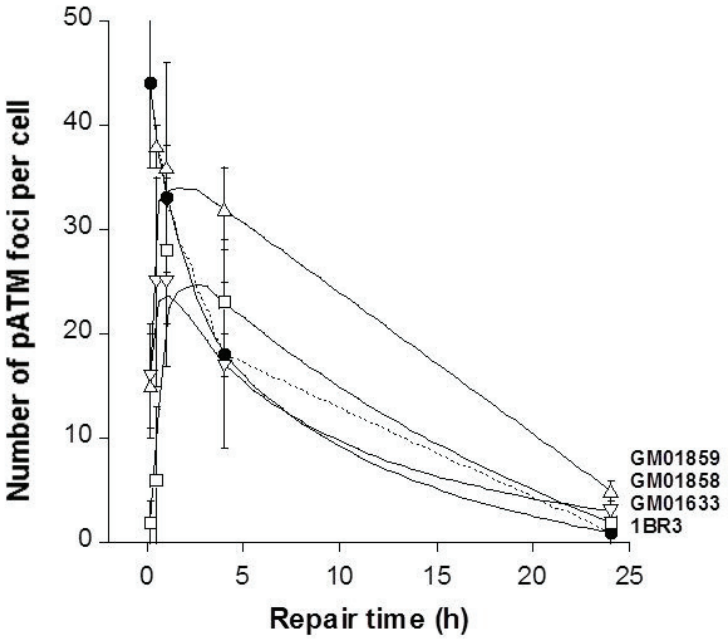


Figure 38 : *Cinétique d'apparition/disparition des foci pATM après 2 Gy les lignées témoins et NF1.*

5.3.2.4 Données avec les statines et les biphosphonates

Concernant l'étude sur la NF1, le traitement ZOPRA n'affecte pas la cinétique d'apparition des foci γH2AX dans la lignée radiorésistante. Lorsque l'on traite les cellules GM01633 au ZOPRA on peut observer un nombre de foci γH2AX après 10 min comparable à ceux observés dans les témoins. Si le traitement ZOPRA ne

modifie pas non plus la cinétique d'apparition des foci pATM dans la lignée témoin, il rétablit significativement le transit de pATM vers le noyau dans la lignée cellulaire de patients atteints par la NF1 (Figure 39). Comme pour la maladie de Huntington, cette restauration du transit cyto-nucléaire d'ATM permettrait la phosphorylation précoce de H2AX après irradiation et augmenterait donc la reconnaissance et la réparation par suture des CDB.

Pour la seconde fois, nous obtenions avec les données de survie, de γH2AX et de pATM, un des exemples concrets d'un modèle de transit d'ATM régulant la radiosensibilité.

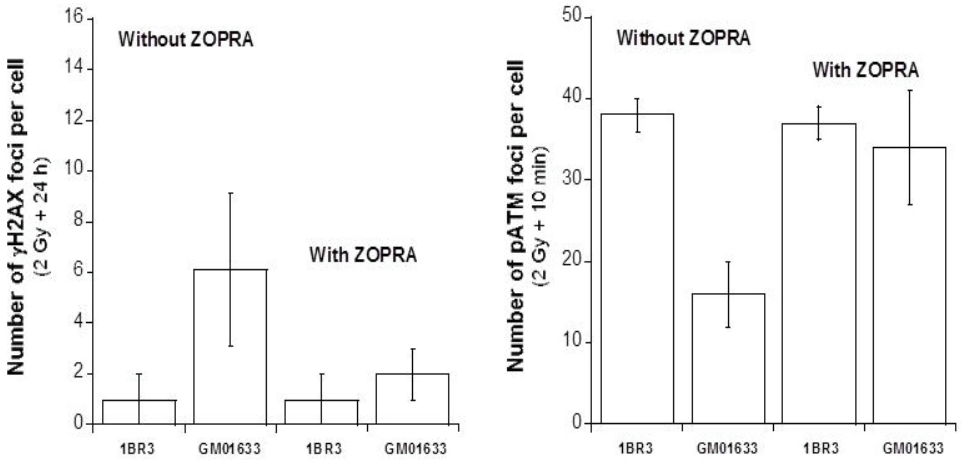


Figure 39 : *Nombre de foci γH2AX et pATM après 2 Gy et 10 min post-irradiation sur des lignées fibroblastiques traitées ou non par ZOPRA. Les lignées testées sont 1BR3 (témoin radiorésistant) et la lignée NF1.*

5.3.2.5 La neurofibromine, protéine partenaire d'ATM

Pour vérifier le rôle de la neurofibromine mutée dans le retard du transit cyto-nucléaire de la protéine ATM, des expériences d'immunoprécipitation d'ATM ont été entreprises (Figure 40). Ces expériences révèlent que la neurofibromine et ATM sont partenaires dans le cytoplasme et qu'après irradiation ce phénomène est exacerbé dans les lignés NF1. Cette observation suggère que le retard de transit serait causé par cette séquestration d'ATM dans le cytoplasme par la neurofibromine mutée.

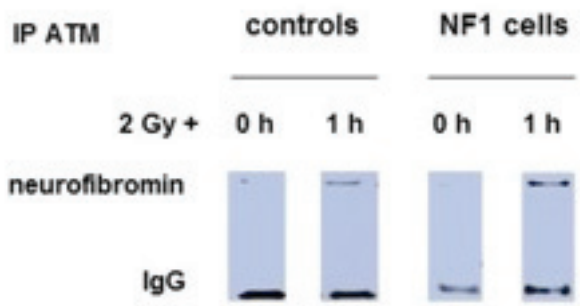


Figure 40 : *Immunoprécipitations d'extraits cellulaires cytoplasmiques de lignées radiorésistantes et NF1 avec des anticorps contre ATM ou NF suivis d'immunoblots croisés. La présence des immunoglobulines G (IgG) sert de témoins de charge.*

5.3.3 Discussion

Les fibroblastes NF1 présentent une radiosensibilité modérée mais significative associées à une mauvaise réparation des CDB et un retard du transit nucleaire d'ATM. Comme la neurofibromine est une protéine cytoplasmique, les défauts de reconnaissance et de réparation des CDB ne peuvent donc pas être un résultat direct de son action dans le noyau. Notre modèle du transit d'ATM apporte donc ici une réponse aux questions posées par la radiosensibilité de la NF1. Nos résultats suggèrent que l'association entre ATM et la neurofibromine dans le cytoplasme pourrait ralentir le transit d'ATM dans le noyau, induisant ainsi des défauts de reconnaissance et de réparation des CDB. Le traitement ZOPRA corrige ces défauts.

5.3.4 Conclusions et Perspectives

Ainsi, comme les syndromes de Bloom ou Cockayne, la NF1 se classe dans le Groupe II de radiosensibilité. Si l'on se réfère à l'article B, les conséquences de cette radiosensibilité modérée sont des réactions attendues de 2 à 3 sur l'échelle des grades CTCAE.

Cet article préfigure un projet de plus grande ampleur visant à caractériser radiobiologiquement une trentaine de biopsies de peau de patient atteint de NF1 en collaboration avec Le centre de compétence pour les neurofibromatoses de Rhône-Alpes-Auvergne et le centre Léon Bérard. Un article résumant ces résultats est en préparation.

5.4 Article IV : La Tubéreuse de Bourneville et le transit d'ATM

Ce chapitre résume l'article IV et présente l'étude de la radiosensibilité de la Tubéreuse de Bourneville. 3 lignées cellulaires de patients ont été utilisées pour la réalisation de ce travail.

5.4.1 Contexte

En 1880, Désirée-Magloire Bourneville décrit pour la première fois un syndrome rare associé à de nombreuses pathologies de la peau, de l'épilepsie ainsi qu'un retard mental et du développement. Comme pour la NF1, la Tubéreuse de Bourneville est aussi associée une formation de tumeurs bénignes, notamment au cerveau.

Suite à la découverte des gènes mis en cause dans le développement de ce syndrome, celui-ci fut renommé TSC syndrome. En effet, des mutations du gènes TSC1, codant pour l'hamartine (1163 aa, 130 kDa) ou TSC2, codant pour la tubérine (1807 aa, 200 kDA), sont à l'origine de cette maladie. TSC1 et TSC2 forment un complexe multimérique d'environ 1 MDa, dont le rôle reste encore à préciser. Toutefois, ce complexe serait impliqué dans le contrôle de la croissance cellulaire par le biais de son action sur le complexe cible de la rapamycine TORC1 (Target Of Rapamycin Complex 1).

Les protéines TSC 1 et 2 sont exprimées surtout dans le cytoplasme et la mutation du gène ne conduit pas forcement à une plus faible expression.

Comme pour les syndromes précédents, c'est la grande étude de Deschavanne et Fertil (1996) qui montre pour la première fois la radiosensibilté de cette maladie.

5.4.2 Résumé des résultats

Le but de l'étude était de vérifier si la mutation TSC2 est associée à un retard du transit de la protéine ATM vers le noyau après irradiation. Dans cet article nous avons observé la voie de réparation ATM-dépendante des CDB radioinduites en utilisant pour modèle des fibroblastes de peau de patients atteints du syndrome TSC.

5.4.2.1 Localisation de la tubérine et de l'hamartine

Comme montré dans plusieurs autres études, la tubérine et l'hamartine sont essentiellement cytoplasmiques et ce, chez les témoins comme chez les cellules mutées pour ces protéines (Figure 41 A et B). Cette conclusion est aussi valable quel que soit le temps après irradiation. Toutefois, un signal plus fort est observable dans les ces dernières, suggérant que la mutation n'entraine pas une inactivation du gène mais une dérégulation de son expression.

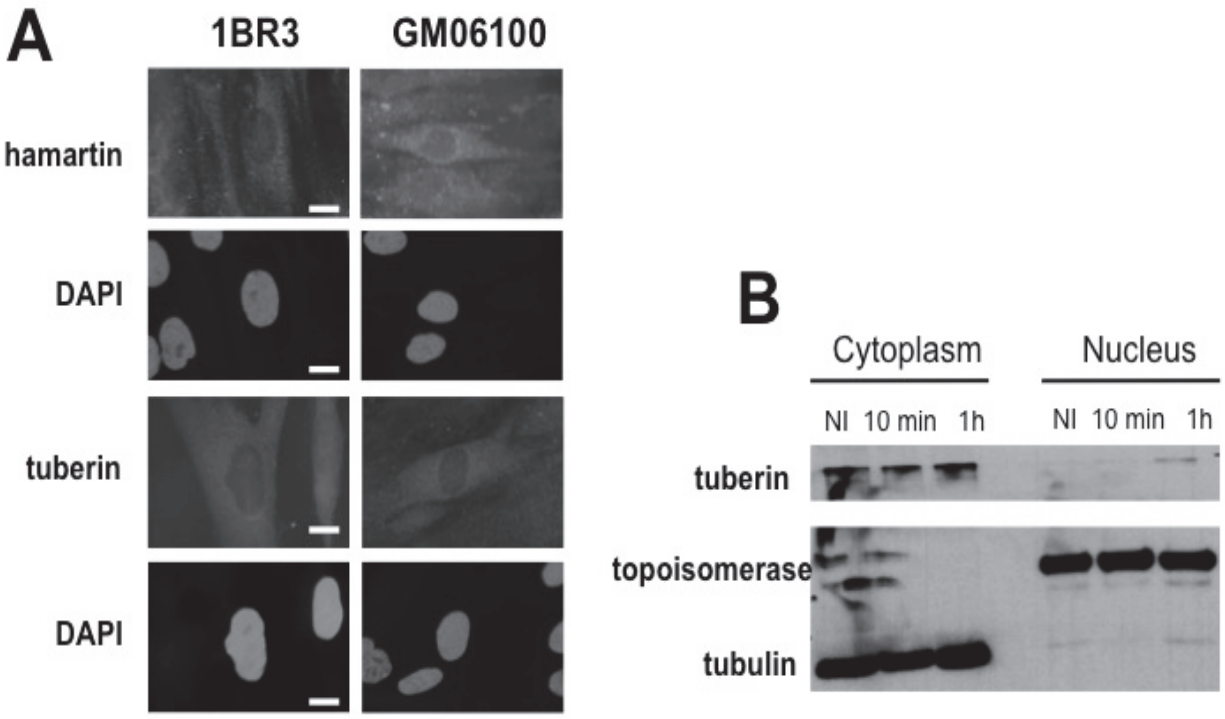


Figure 41 : A *Exemples de localisation de TSC1 et TSC2 sur des lignées radiorésistantes (1BR3) ou mutées (TSC), observés par immunofluorescence sans irradiation. La contre-coloration au 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) indique l'emplacement du noyau.* ***C :*** *Visualisation de la localisation de la tuberine par westernblot d'extraits cytoplasmiques et nucléaires de cellules témoins ou TSC. La tubuline sert de contrôle de charge.*

5.4.2.2 Survie cellulaire

La survie clonogénique de la lignée de fibroblastes GM06100 montre une SF2 de 24 ± 2 % montrant ainsi une radiosensibilité modérée mais significative (Figure 42)

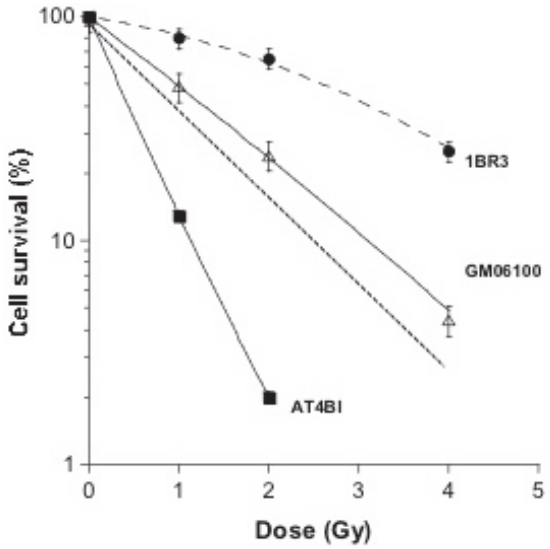


Figure 42 : *Ajustements des courbes de survie des lignées fibroblastiques les plus représentatives (1BR3, lignée témoin radiorésistante ; AT5BI, lignée ATM$^{-/-}$; ainsi que celle de la lignée GM06100 (lignée TSC).*

5.4.2.3 Données γH2AX

Ici encore, le nombre de foci γH2AX spontanés observé en immunofluorescence est comparable entre les témoins et les cellules TSC (0.2 ± 0.5 vs. 0.6 ± 0.4 foci γH2AX par cellule en moyenne). Nous avons ensuite procédé à l'étude de la cinétique de réparation des CDB de 0 à 24h après irradiation à 2 Gy (Figure 43A). Dans la lignée témoin, on observe 10min après irradiation 75 ± 6 par cellules. Pour les cellules TSC ce nombre est systématiquement inférieur (41 ± 3 foci par cellule en moyenne, $p<0.001$) (Figure 43 A et B). Les fibroblastes TSC ne présentent pas de différences significatives dans leur nombre de foci γH2AX persistants 24h après irradiation par rapport aux témoins 1BR3. Ces foci γH2AX résiduels observés chez les patients TSC après irradiations sont moins nombreux que chez les patients hyper-radiosensibles mutés dans la protéine ATM (lignée AT5BIVA) ou Ligase IV (lignée 180BR), suggérant une radiosensibilité signifiante mais modérée des patients atteints de TSC.

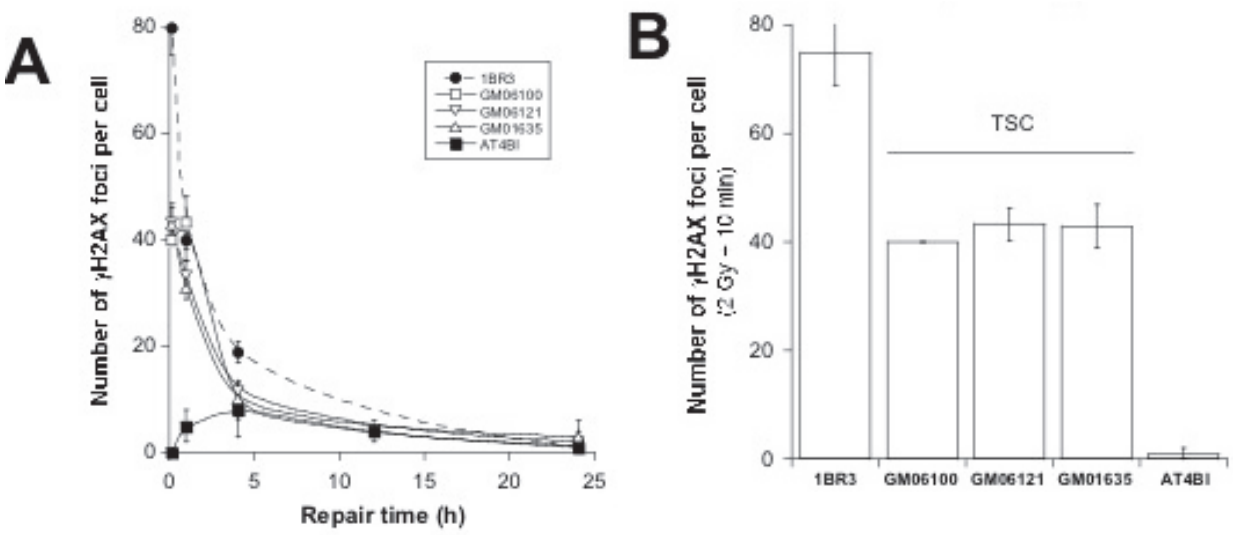


Figure 43 : A *Cinétique d'apparition/disparition des foci γH2AX après 2 Gy pour différentes lignées fibroblastiques incluant les lignées TSC.* **B** représentation histographique du nombre de foci *γH2AX 10min après irradiation pour les mêmes lignées.*

5.4.2.4 Données pATM

Comme vu dans les résumé des articles précédents, l'exposition à 2 Gy des cellules témoins 1BR3 conduit à un transit rapide de pATM et à la formation de foci nucléaires après 10 min. Un retard dans le transit d'ATM vers le noyau est observé dans les lignées TSC (GM06100: 23 ± 3; GM06121: 25 ± 2; GM01635: 20 ± 2 et 1BR3: 39 ± 3; $p<0.01$) (Figure 44). Ici aussi la cinétique d'apparition et de disparition des foci pATM des cellules TSC se voit altérée, suggérant que les mutations impliquées dans TSC peuvent causer un retard du transit et un défaut d'activité de la protéine ATM.

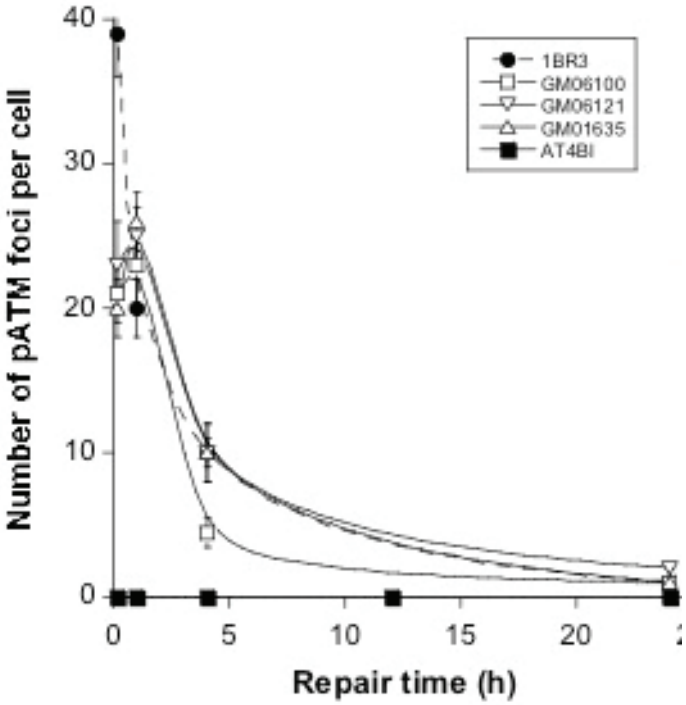


Figure 44 : *Cinétique d'apparition/disparition des foci pATM après 2 Gy pour les lignées témoins et TSC.*

5.4.2.5 Données avec les statines et les biphosphonates

Comme pour la maladie de Huntington et la Neurofibromatose de type I, le traitement ZOPRA rétablit significativement le transit de pATM vers le noyau dans la lignée cellulaire de patient atteint par la TSC (68 ± 7 versus 41 ± 3 foci γH2AX pour, respectivement, les cellules GM01635 traitées ou non au ZOPRA; $p<0.001$) (Figure 45A) Après 24 h on peut aussi observer une diminution des foci résiduels (1 ± 1 versus 3 ± 1 pour, respectivement, les cellules GM01635 traitées ou non au ZOPRA; $p<0.001$)(Figure 45B).

De même, le ZOPRA contribut à accelerer significativement le transit d'ATM vers le noyau dans les cellules mutées (35 ± 4 pATM foci 10 min après 2Gy versus 20 ± 5 pour, respectivement, les cellules GM01635 traitées ou non au ZOPRA; $p<0.001$)(Figure 45C)

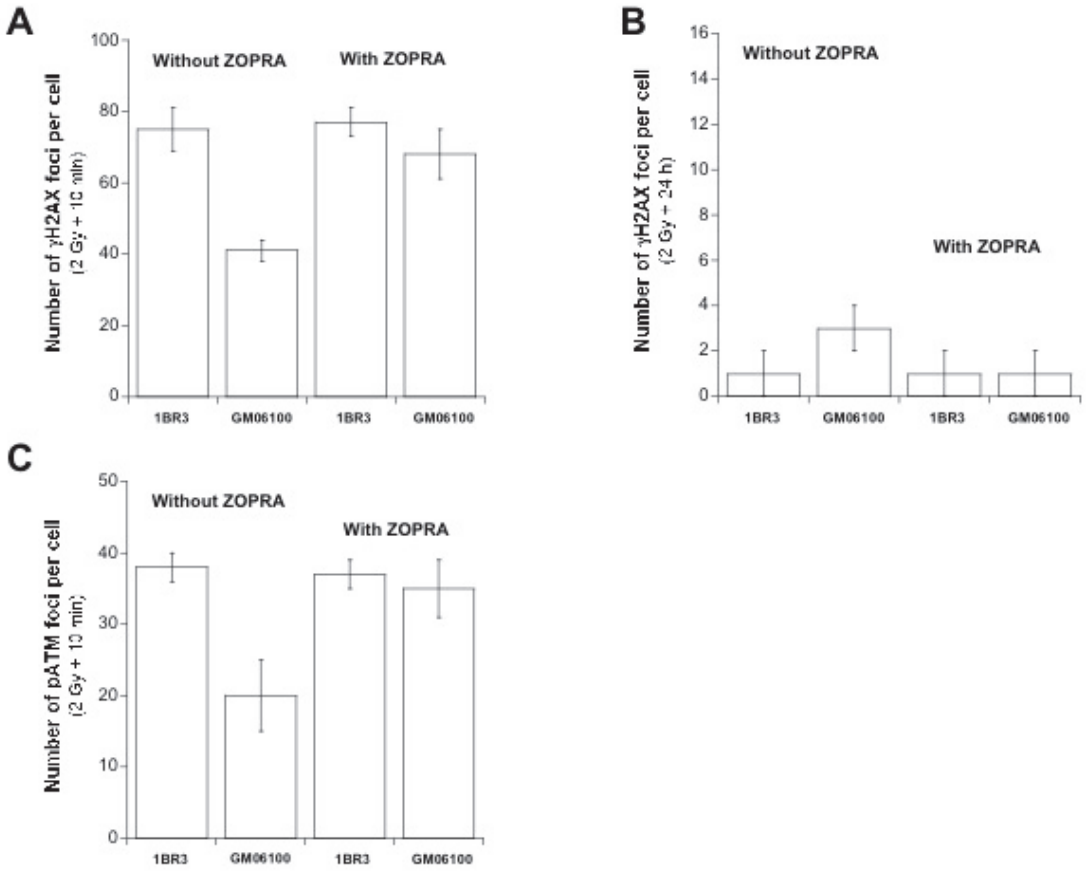


Figure 45 : ***A*** *Nombre de foci γH2AX 10min et* ***B*** *24h après 2Gy.* ***C*** *Nombre de foci pATM après 2 Gy et 10 min post-irradiation sur des lignées fibroblastiques traitées ou non par ZOPRA. Les lignées testées sont 1BR3 (témoin radiorésistant) et la lignée TSC.*

5.4.2.6 La tubérine, protéine partenaire d'ATM

Pour expliquer le rôle de la tubérine mutée dans le retard du transit cyto-nucléaire de la protéine ATM, des expériences d'immunoprécipitation ont été réalisées. D'après ces expériences on constate que la tubérine et ATM sont partenaires dans le cytoplasme des cellules TSC2 et qu'après irradiation ce phénomène reste stable. Un tel complexe n'est pas observé chez les lignées témoins (Figure 46). L'interaction entre ATM et la tubérine peut être à l'origine du retard de transit d'ATM et donc de la radiosensibilité observées chez les patients atteints du syndrome TSC.

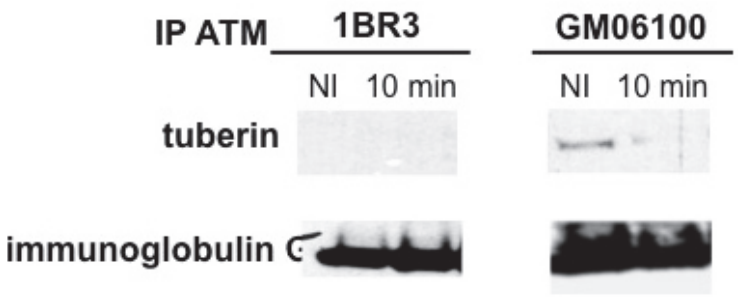


Figure 46 : *Immunoprécipitations d'extraits cellulaires cytoplasmique de lignées radiorésistantes et TSC avec des anticorps contre ATM ou TSC2 suivis d'immunoblots croisés. La présence des immunoglobulines G (IgG) sert de témoins de charge.*

5.4.3 Discussion

Les fibroblastes issus de patients atteints de TSC montrent une radiosensibilité modérée mais significative ainsi qu'un défaut de réparation des CDB. Cette observation suggère qu'une protéine TSC2 fonctionnelle est requise pour le bon fonctionnement de l'activité kinase d'ATM et que l'interaction entre les deux protéines se ferait dans le cytoplasme. Il est à noter que la tubérine possède des sites SQ et TQ pouvant être phosphorylés par ATM. La mutation hétérozygote de TSC2 conduirait à une augmentation de la quantité de protéine TSC2 mutées dans le cytoplasme pouvant ainsi séquestrer ATM.

5.4.4 Conclusions et Perspectives

Ce syndrome rejoint la MH et la NH1 dans le groupe II de radiosensibilité défini par notre laboratoire. D'après l'article B, les patients pourraient montrer des réactions de grades 2 à 4 sur l'échelle CTCAE suite à une radiothérapie. Un soin tout particulier doit être apporté lors de l'élaboration du traitement de ces patients à risque.

5.5 Article V : Le syndrome Hutchinson-Girlford et le transit d'ATM

L'article V aborde l'application du modèle du transit d'ATM chez les patients atteints du syndrome progeroïde de Hutchinson-Girlford (HGPS) et l'effet du traitement ZOPRA non seulement sur le phénotype « vieillissant » des cellules mais aussi sur la reconnaissance et la réparation des CDB. Il explique comment une protéine du nucleo-squelette peut interagir avec ATM et causer une radiosensibilité par défaut de reconnaissance et réparation de l'ADN après irradiation.

5.5.1 Contexte

Le syndrome de Hutchinson-Gilford, est une maladie de vieillissement prématuré causée par la mutation hétérozygote du gène LMNA. Cette mutation conduit à la production de progerine, une prélamine A, plus courte de 50 acides aminés mais qui conserve son ancrage farnesylique. Récemment, il a été montré que, dans des lignées HGPS, l'inhibition de la prénylation de la progerine par la pravastatine et le zolédronate (ZOPRA) pouvait diminuer partiellement phénotype lié au vieillissant et compensé certains défauts dans la réparation des CDB induites par les rayons X.

5.5.2 Résumé des résultats

Ici nous avons étudié la reconnaissance, réparation des CDB ainsi que l'effet du traitement ZOPRA sur ces deux paramètres. Nous disposions de fibroblastes de peau de 2 patients atteints de HGPS.

5.5.2.1 Données γH2AX

Dans les fibroblastes HGPS, le nombre de foci γH2AX observés 10 min après irradiation est légèrement inférieur à celui des témoins 1BR3 (35 ± 2 γ-H2AX foci par cellule par Gy vs. 40 ± 4 foci γH2AX par cellule par Gy, $p < 0,05$), suggérant une altération du processus de reconnaissance des CDB. De plus, les fibroblastes HGPS présentent une vitesse de réparation plus lente, notamment avec une plus grande quantité de foci γH2AX persistants 24h après irradiation (10 ± 2 γ-H2AX par cellule HGPS, 2 ± 2 par cellule pour 1BR3) ($p < 0,03$)) (Figure 47, Gauche)

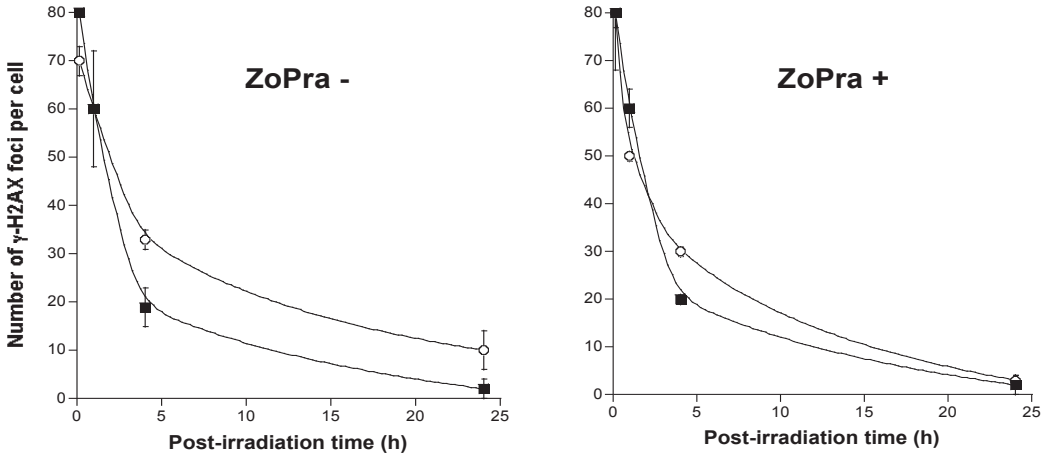


Figure 47 : *Cinétique d'apparition/disparition des foci γH2AX de 0 à 24H après 2 Gy sur des lignées fibroblastiques traitées ou non par ZOPRA. Les lignées testées sont 1BR3 (témoin radiorésistant, carrés noirs) et la lignée HGPS (ronds blanc).*

5.5.2.2 Données pATM

L'exposition à 2 Gy des cellules témoins 1BR3 conduit à un transit rapide de d'ATM et à la formation de foci nucléaires après 10 min. Un retard dans le transit d'ATM vers le noyau est observé dans les lignées HGPS avec seulement 20 foci pATM au lieu des 40 attendus chez les témoins. Cependant ici, la cinétique d'apparition et de disparition des foci pATM des cellules HGPS ne se voit pas altérée. 24h après irradiation, le nombre de foci pATM résiduels est similaire entre les témoins et les lignées HGPS. (Figure 48, Gauche)

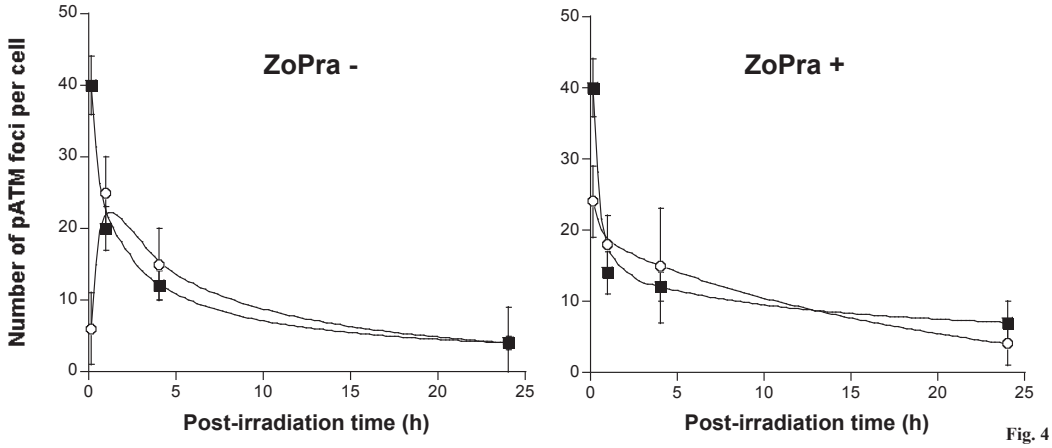


Figure 48 : *Cinétique d'apparition/disparition des foci pATM de 0 à 24h après 2 Gy sur des lignées fibroblastiques traitées ou non par ZOPRA. Les lignées testées sont 1BR3 (témoin radiorésistant, carrés noirs) et la lignée HGPS (ronds blanc).*

5.5.2.3 Données avec les statines et les biphosphonates

5.5.2.3.1 ZOPRA et chromatine

La protéine HP1α est connue pour être impliquée dans le maintien de l'organisation de la chromatine. Les foci HP1α peuvent servir de marqueurs quantifiant la décondensation de la chromatine. Le nombre de foci HP1α est plus grand dans des fibroblastes HGPS que dans des cellules témoins suggérant une chromatine anormalement décondensée. Cette décondensation semble diminuer lorsque que l'on applique le traitement ZOPRA. Ces données suggèrent que l'instabilité génomique significative des cellules HGPS, notamment due à une décondensation de la chromatine, peut être partiellement restaurée par la réduction de la farnesylation de la progérine.

5.5.2.3.2 ZOPRA reconnaissance et réparation de CDB

Comme pour la maladie de Huntington, la Neurofibromatose de type I et le syndrome TSC, le traitement ZOPRA rétablit significativement le transit de pATM vers le noyau dans la lignée cellulaire de patient atteint par la HPGS (6 ± 5 dans les cellules non traitées à 24 ± 5 dans les cellules traitées) (Figure 48, Droite) restaurant ainsi une meilleure reconnaissance et réparation des CDB (Figure 47, Droite).

5.5.3 Discussion

Cette étude montre que l'HGPS est associée à une déficience précoce de l'activité ATM kinase dont les conséquences sont une mauvaise reconnaissance et réparation des CDB. L'HGPS présente aussi une instabilité génomique importante liée à une décondensation de la chromatine ainsi qu'une activation de voies de réparations fautives (voir détails en annexes). Le traitement ZOPRA permet une amélioration de ces défauts. Nos résultats suggèrent que la présence de progérine altérée affecte le nucléo-shuttling d'ATM et réduit l'activation des voies de signalisation et de réparation qui en dépendent.

5.5.4 Conclusion et perspectives

Comme suggéré par les publications parues dans les années 80, le syndrome de Hutchinson-Gilford confère une radiosensibilité au patients atteints. Grace aux expériences réalisées dans cet article, on peut désormais le classer dans la limite basse du groupe II.

5.6 Article VI : Métaux et transit d'ATM

L'article VI traite de l'effet génotoxique de certains métaux, non seulement par leur effet cassant mais aussi par leur effet sur le transit d'ATM conduisant à l'inhibition de la réparation des CDB.

5.6.1 Contexte

Les métaux sont utilisés abondamment dans un certain nombre d'activités industrielles telles que l'exploitation minière, la métallurgie, la production d'engrais, les peintures, les piles et, plus récemment, les produits de haute technologie. Un certain nombre d'expositions accidentelles au métal ont augmenté notre connaissance de leur toxicité. En plus des effets toxiques, l'exposition accidentelle et/ou chronique aux métaux peut également augmenter le risque de cancer. Les métaux représentent donc un véritable problème de santé publique à travers deux grandes caractéristiques: la toxicité et le risque de cancer. Cependant, malgré un nombre considérable de données, les bases moléculaires et cellulaires de la toxicité induite par les métaux et/ou leur cancérogénicité restent méconnues.

5.6.2 Résumé des résultats

Ici nous nous proposons d'étudier les effets de 8 métaux (13 espèces métalliques) sur les voies de détections et de signalisations des CDB de lignées fibroblastiques et astrocytaires.

5.6.2.1 CDB induites par les métaux

Pour la plupart des espèces de métaux testées, les courbes dose-réponse sont sigmoïdales sans que nous ayons pu atteindre, aux concentrations testées ici, la phase de plateau de saturation caractéristique de ce genre de courbe.

Toutes les espèces métalliques testées sont caractérisées par une concentration seuil en métal dans la plage µM ou dans la plage nM (pour Na2CrO4 seulement). Dans l'ensemble, les données fournies par l'observation des foci γH2AX suggèrent que les espèces de métaux testées ici peuvent induire des CDB directement ou indirectement (Figure 49).

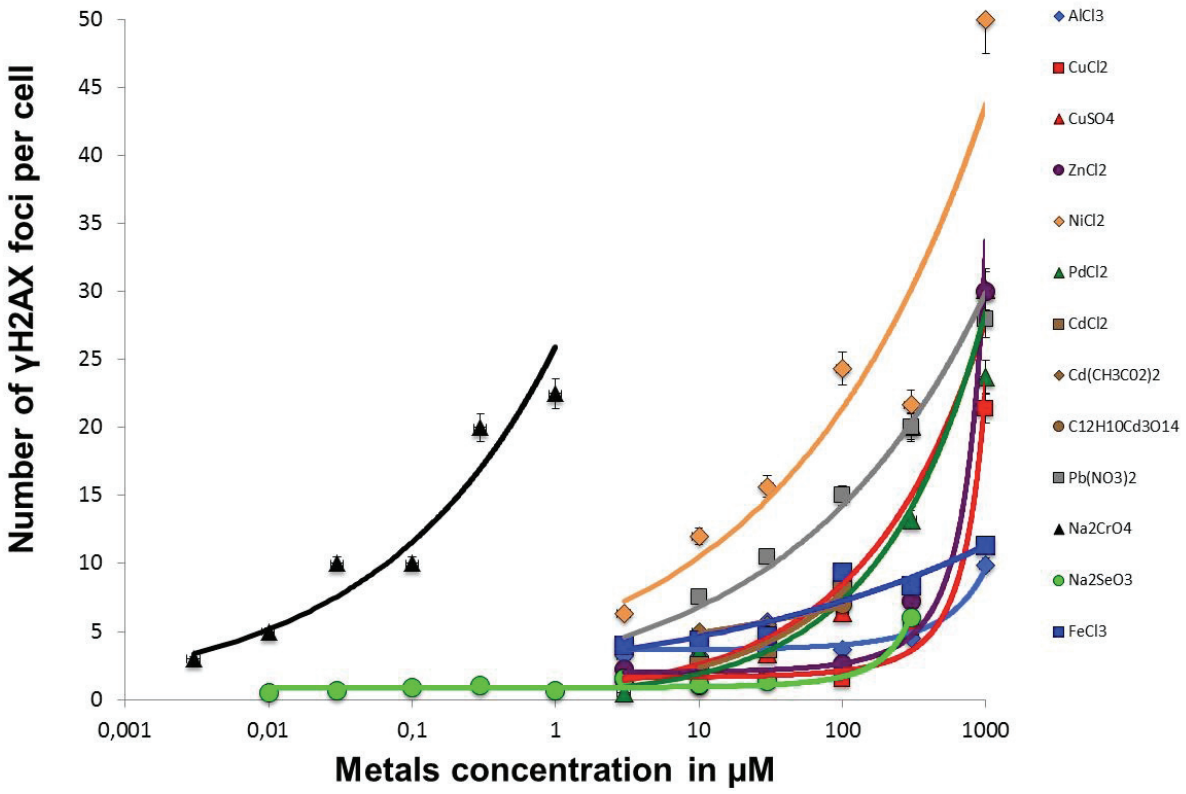


Figure 49 : *Nombre de foci dans la lignée de fibroblastes humains 149BR après 24H d'incubation aux concentrations de métaux indiquées.*

Dans les mêmes conditions, nous avons étudié d'autres paramètres qui sont généralement associés à des CDB sévères tels que les taux de micronoyaux et de cellules fortement endommagées (HDC). Le nombre de micronoyaux évolue de manière linéaire en fonction de la concentration en métal pour toutes les espèces testées. L'évolution du taux de HDC est similaire aux courbes d'apparition des foci γH2AX suggérant une valeur seuil nécessaire à l'apparition du phénomène, cette valeur étant spécifique à chaque métal (Figure 50).

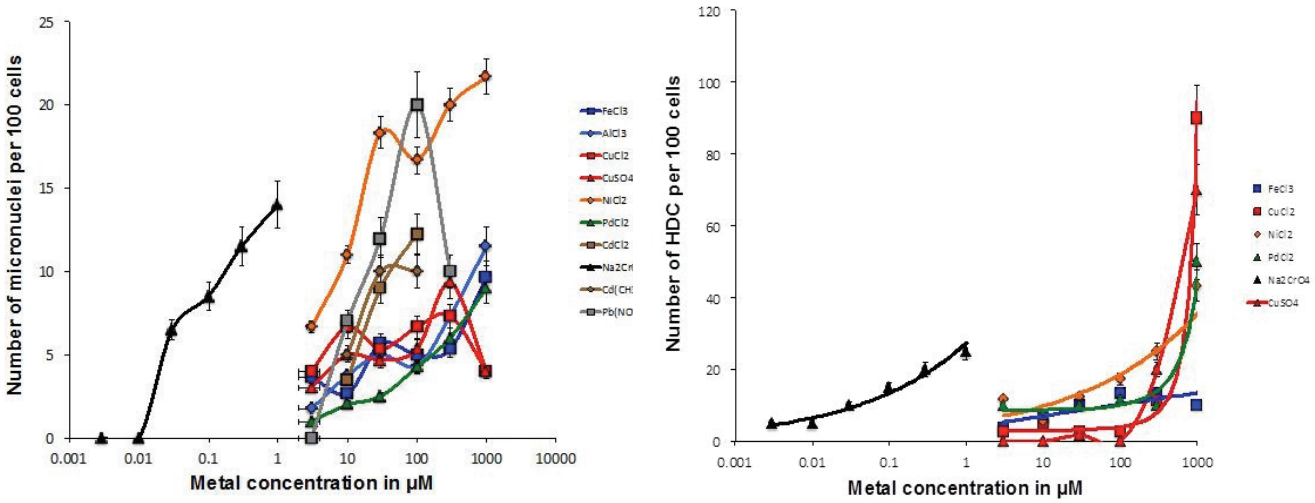


Figure 50 : *Nombre de micronoyaux (panneau de gauche) ou d'HDC (panneau de droite) pour 100 cellules aux concentrations de métaux indiquées.*

5.6.2.2 Influence des métaux dans la réparation des CDB radio-induites

La grande majorité des données qui résultent de nos expériences laissent entendre que la présence de métal peut affecter la reconnaissance et/ou la réparation des CDB. Cependant, l'impact quantitatif sur ces deux étapes est fortement dépendant du métal considéré et de la concentration testée. Par exemple, en comparant le nombre de foci γH2AX 10 min après irradiation, il apparaît que le Pb(NO3), le NiCl2 ou le Na2CrO4 perturbent considérablement le la reconnaissance des CDB. De manière similaire, en traçant le nombre de foci γH2AX obtenus 24 h post-irradiation et les données correspondantes obtenues sans irradiation, il a pu être observé un fort défaut de réparation des CDB radio-induites.

5.6.2.3 Influence des métaux sur le transit d'ATM

En appliquant une immunofluorescence anti-pATM aux cellules contaminées et irradiées, le nombre des foci nucléaires de pATM évalués 10 minutes après irradiation est généralement inférieur à ceux obtenus avec des cellules non contaminées.

Ces résultats suggèrent que, tout comme les rayonnements ionisants, les métaux obéissent à la théorie du nucléoshuttling d'ATM.

5.6.2.4 Influence du tissu sur la réponse à la contamination par les métaux

La théorie du transit d'ATM est en accord avec une réponse au stress qui serait spécifique des tissus. En effet, la motilité d'ATM vers le noyau s'est révélée fortement dépendante du volume du cytoplasme conditionnant ainsi le temps de parcours moyen des molécules ATM. Puisque la réponse aux contaminations, par les métaux, du cerveau (pour les pathologies neuronales) et des cellules cutanées (pour le contact cutané) est particulièrement intéressante, nous avons évalué le nombre de foci γH2AX et de micronoyaux restant après incubation avec du métal pendant 24 h pour 3 types d'astrocytes humains non transformés provenant du même donneur.

Tandis que la lignée cellulaire fibroblastique de peau décrit une fonction linéaire si l'on exprime les foci γH2AX en fonction des micronoyaux avec environ 1 foci γH2AX pour 0,01 micronoyau, cette valeur de pente est de 0,3 pour les astrocytes de la moelle épinière (semblable à la pente obtenue avec les rayons X) et de 0,07 pour les deux autres lignées de cellules astrocytaires, ce qui suggère 3 et 14 fois plus de micronoyaux pour un même nombre de foci γH2AX. Afin d'expliquer ces différences, nous avons évoqué, la possibilité que de faibles concentrations de métaux puissent stimuler la prolifération cellulaire, ce qui favoriserait la formation de micronoyaux. Une autre explication, plus compatible avec la théorie du nucléoshuttling d'ATM, consisterait à considérer que le retard du transit nucléaire d'ATM est si important que le nombre de CDB induites par les métaux augmente avec leurs concentrations. En conséquence, il n'y a pas d'augmentation drastique du nombre de foci γH2AX car il y a moins de monomères ATM pour phosphoryler H2AX sur les sites de CDB. Inversement, chaque CDB non reconnue (et donc non réparée) est transformée en micronoyaux. En plus d'une absence réduite de monomères ATM dans le noyau, le processus de recombinaison, une autre voie de réparation CDB peut être sur-activé : le processus d'hyper-recombinaison peut augmenter le nombre de CDB sans augmenter le nombre de foci γH2AX. S'il est vérifié, ce phénomène suggère que l'immunofluorescence anti-γH2AX peut ne pas détecter systématiquement toutes les CDB non réparées qui participent à la toxicité.

5.6.2.5 Hypersensibilité aux faibles concentrations de métaux

Si le stress génotoxique est trop faible, pour induire la monomérisation d'ATM mais suffisant pour créer des CDB, le nombre de monomères ATM produits dans le cytoplasme sera réduit et, par conséquent, le processus d'hyper-recombinaison peut accumuler plus de CDB, c'est l'équivalent du phénomène d'hypersensibilité aux faibles doses (hypersensitivity to low dose (HRS) observé en radiobiologie.

Il est intéressant de noter qu'en étudiant les effets biologiques de la contamination des métaux dans d'autres types cellulaires, nous avons observé ce phénomène HRS pour la lignée cellulaire épithéliale mammaire humaine (HMEC) à 30 µM AlCl3. À cette concentration, le nombre de foci γH2AX est équivalent à celui attendu à pour une concentration de 115 µM (c'est-à-dire une concentration 3,8 fois supérieure). Ce phénomène non linéaire n'a pas été observé avec des lignées fibroblastiques de peau radiorésistantes (Figure 51).

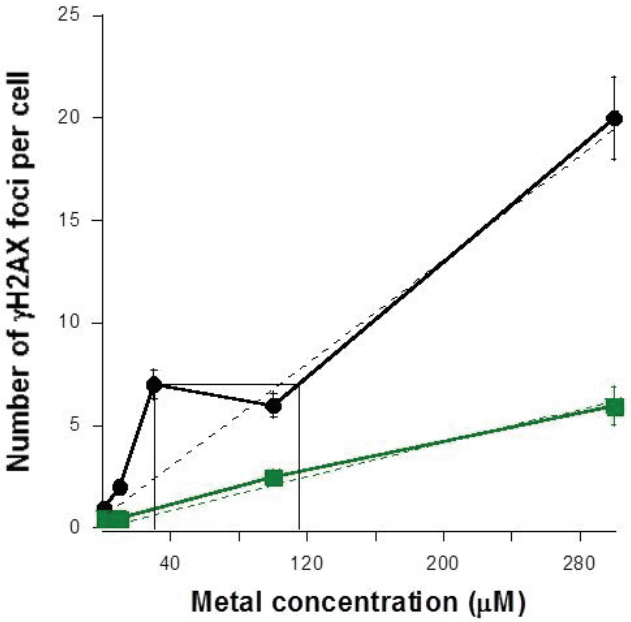


Figure 51 : *Exemple représentatif du phénomène HRS observés après 24h d'incubation aux concentrations indiquées de $AlCl_3$ dans des cellules HMEC (en noir) et la lignée témoins 149BR (vert).*

5.6.3 Discussion

Des progrès impressionnants en radiobiologie ont contribué à établir les CDB non réparées comme critère clé pour quantifier la mort cellulaire. En revanche, l'exposition aux métaux a été considérée comme étant trop faible énergétiquement pour produire des CDB. Cependant, la présente étude montre que certains métaux appliqués à différents tissus peuvent entraîner la production de CDB non réparées et/ou contribuer inégalement à augmenter leur sévérité. Par conséquent, il était logique d'étudier et de comparer le devenir de des CDB radio-induites et métallo-induites dans différents types de cellules. Malheureusement, les deux marqueurs les plus utilisés pour quantifier les CDB, à savoir les tests γH2AX et les micronoyaux, ne fournissent pas nécessairement la même information. En effet, nos données ont montré des limitations de l'application du test γH2AX pour quantifier le risque, et le manque de détectabilité du dosage des micronoyaux. Il est intéressant de noter que la quantification des foci γH2AX et des micronoyaux semblent ne pas être suffisamment performants pour discriminer la réponse intermédiaire au rayonnement, ce qui suggère que le rendement en CDB non réparées ou les micronoyaux résiduels peuvent ne pas être les meilleurs paramètres moléculaires pour prédire la toxicité.

5.6.4 Conclusions et perspectives

Ainsi, nos résultats ont montré un lien cohérent et quantitatif entre les foyers γH2AX, les foyers pATM, les micronoyaux et les cellules HDC pour les treize espèces de métaux testées. Les données sont en accord avec un retard du nucleoshuttling d’ATM qui se produirait et des concentrations élevées spécifiques à chaque métal. Le phénomène HRS et la dépendance tissulaire dans la réponse à la contamination par les métaux ont été observés. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent fortement que la théorie du transit d’ATM est applicable aux métaux. Un modèle mécaniste général peut être proposé: les métaux qui entrent dans les cellules créent, via des réactions de type Fenton, un stress oxydatif dans le cytoplasme qui peut déclencher la monomérisation ATM. Ces métaux créent aussi un stress oxydatif dans le noyau ce qui peut déclencher la formation CSB et CDB. Les taux de monomérisation ATM et de formation de dommages à l'ADN sont différents et dépendent fortement du type cellulaire et de l'espèce métallique.

5.7 Pesticides et transit d'ATM (article en préparation)

5.7.1 Contexte

La génotoxicité in vitro des pesticides est aujourd'hui assez bien documentée. Toutefois, une analyse de la littérature montre une très grande variété dans les méthodologies appliquées que ce soit pour les modèles cellulaires utilisés, les doses et concentrations appliquées ou les paramètres biologiques mesurés. Une telle diversité reflète ainsi une certaine incertitude concernant les mécanismes qui conduisent à la mort cellulaire (toxicité) ou la transformation cellulaire (cancer).

Suite au résultats de l'article précèdent validant notre modèle pour les métaux comme le Cu, Al, Zn, Fe, Se, et suite à l'application préliminaire de notre méthodologie systématique au lindane, pesticide d'intérêt domestique et environnemental (PIDE) qui a confirmé également que cet agent est cassant à faibles doses. Nous avons décidé d'appliquer notre modèle à un grand nombre de PIDEs.

Ainsi, dans le cadre de l'Appel ONCOSTARTER, nous avons proposé d'établir des courbes de références sur la formation, la reconnaissance, la réparation et la signalisation des CDB sur les PIDEs les plus courants. Ce projet doit nous permettre d'identifier de façon préliminaire : 1) les premiers statuts génétiques à risque pour les PIDE ; 2) les premiers tissus à risque ; 3) ainsi qu'un premier modèle pour d'éventuels effets cocktail.

5.7.2 Résultats préliminaires et conclusions

Les expériences par immunofluorescence ont été effectuées sur 3 lignées fibroblastiques humaines provenant d'individus différents (dont 1 témoin résistant) avec 5 PIDEs : lindane, atrazine, pentachlorophénol, perméthrine, glyphosate et thiobendozate.

Plusieurs conclusions peuvent être dressées :

- Chaque PIDE est caractérisé par son IC50 et produit un taux spécifique de cassures double-brin (CDB) et de micronoyaux, plutôt associé à la toxicité

- Chaque PIDE est caractérisé par son propre pouvoir inhibiteur du transit cyto-nucléaire d'ATM, plutôt associé à la carcinogénicité.
- De façon intéressante, le pouvoir inducteur et le pouvoir inhibiteur ne sont pas les mêmes suivant les lignées et les PIDEs. Par exemple, pour les lignées témoins, l'atrazine et le pentachlorophénol semblent ne pas agir sur le transit d'ATM alors qu'ils produisent un nombre de micronoyaux important. A l'inverse la perméthrine et le glyphosate ont une action retardante sur le transit d'ATM mais produisent peu de CDB. Le lindane appartient à cette dernière catégorie.
- Pour les patients qui montrent déjà un retard de transit d'ATM, les phénomènes sont exacerbés : les PIDEs peu inhibiteurs du transit d'ATM chez les témoins le deviennent et les PIDEs inducteurs de CDB en produisent encore plus. Pour cette dernière catégorie, l'augmentation du nombre de CDB produirait une augmentation d'oxydation dans le cytoplasme telle qu'elle stimulerait le transit d'ATM de façon très significative.
- Ces deux catégories de PIDEs suggèrent des actions carcinogènes et génotoxiques différentes. Elles donnent des clés pour prédire les effets cocktails (inducteur+inhibiteur). Des tissus naturellement caractérisés par un retard du transit d'ATM seraient plus particulièrement à risque pour les pesticides.
- Nos données montrent finalement que notre hypothèse de travail (les pesticides agissent sur le transit d'ATM) est bien validée.

5.7.3 Perspectives

Un projet Plan Cancer axé sur l'effet des pesticides associés au cuivre dans le domaine viticole a été accepté récemment et fera donc le lien entre cet article et l'article VI.

5.8 Résumé de la revue A :

Revue critique consacrée aux principaux tests fonctionnels de prédiction de la radiosensibilité.

Une compréhension complète des mécanismes de la réponse aux radiations permettrait une meilleure évaluation des risques induits par celles-ci. La radiosensibilité individuelle, c'est-à-dire la propension à des réactions tissulaires induites par le rayonnement attribuable à la mort cellulaire, a été documentée depuis le début du 20ème siècle. Depuis plusieurs décennies, développer des tests prédictifs performants est l'un des défis les plus importants des radiobiologistes. Cet article est une revue critique consacrée aux principaux tests fonctionnels de prédiction de la radiosensibilité. Nous aborderons leurs forces et leurs faiblesses, notamment celles des tests basés sur la quantification de la survie cellulaire clonogénique, des micronoyaux, de l'expression p21, de l'apoptose, et de la réparation et la signalisation des chromosomes et de l'ADN.

5.9 Résumé de la revue C :

Effets de répétitions de doses d'irradiation et réparation de l'ADN : importance du facteur individuel et de l'intervalle de temps entre les doses

L'effet du fractionnement de la dose d'irradiation est une question récurrente qui reste globalement irrésolue car aucun modèle ne permet aujourd'hui de déduire l'effet clinique par la seule donnée de la dose cumulée et des caractéristiques radiobiologiques des tissus irradiés. Cette question importante est abordée différemment en radioprotection, radiothérapie, radiologie ou épidémiologie. Une meilleure compréhension de la réponse moléculaire aux radiations rend aujourd'hui possible une approche nouvelle pour identifier les paramètres qui conditionnent l'effet du fractionnement. En particulier, l'intervalle de temps entre les doses apparaît comme un facteur essentiel puisqu'il permettra, ou non, la réparation de certains

dommages radio-induits de l'ADN comme les dommages de bases, les cassures simple-brin ou les cassures double-brin dont les rythmes de réparation sont respectivement de l'ordre de la seconde, de la minute ou de l'heure: l'effet de fractionnement variera alors suivant les statuts fonctionnels de ces voies de réparation, que ce soit pour les tissus sains comme pour les tumeurs.

5.10 Commentaire d'article et chapitre d'ouvrage

En 2016, les travaux de l'article I sur la chorée de Huntington ont suscité l'intérêt des cliniciens et des éditeurs de revues spécialisées dans les maladies neurodégénératives et plus particulièrement celles consacrées à la MH. Ainsi nous fûmes invités à participer à la rédaction d'un chapitre de l'ouvrage *« Huntington's disease : prévalence, pathogenesis and treatments »* et à un commentaire de l'article de Mollica *et al.* dans The American Journal of pathology (Article II).

6. DISCUSSION GENERALE

6.1 A la recherche des radiosensibilités intermédiaires

Comme la revue A le montre, cette thèse s'inscrit dans une recherche sur la radiosensibilité par des tests fonctionnels basés spécifiquement sur la signalisation des CDB. En effet, il apparaît que depuis les années 80, toutes les approches prédictives adoptées concernaient plutôt la biologie cellulaire (ex : test de survie clonogénique), la cytogénétique (ex : test des micronoyaux) ou la biologie moléculaire (ex : tests de réparation de l'ADN). L'observation que certains syndromes génétiques qui ne sont pas des réparatoses puissent être associés à une radiosensibilité significative confirmait qu'un test prédictif basé seulement sur la mesure de la fonctionnalité de la réparation des CDB n'était pas suffisant. Parallèlement, il paraissait évident que pour prédire la radiosensibilité, il fallait irradier les cellules (Revue A).

De plus de ces prérequis, nous avons également souligné dans la revue A l'importance d'une compatibilité numérique entre les paramètres les plus prédictifs. En effet, alors que la SF2 chez l'homme varie de 1 à 60% pour les fibroblastes, le taux de micronoyaux ou de CDB non réparées ne varie que de 0 à 12%. Par contre, le paramètre pATMmax (article B) qui reflète le nombre maximal de foci pATM varie de 0 à 50. Comme toutes ces approches prédisaient bien les radiorésistants et les hyper-radiosensibles, un intervalle numérique réduit entraînait nécessairement une mauvaise prédiction pour les radiosensibilités intermédiaires (revue A). Cette notion de *compatibilité numérique* n'avait jusqu'à présent pas été soulevée. La prédiction des radiosensibilités intermédiaires devint donc un véritable enjeu. En effet, dans la figure 1 de l'article B, on voyait bien que les foci γH2AX et les micronoyaux prédisaient les grades CTCAE extrêmes 0 et 5 et moins bien les grades 2 à 4 (Article B).

En début de thèse, l'immunofluorescence anti-γH2AX apparaissait comme le meilleur des tests prédictifs. Toutefois, il faut noter que l'article princeps de Rothkamm et Löbrich (55) ne montrait que des cinétiques de réparation des CDB issues des fibroblastes radiorésistants et des fibroblastes hyper-radiosensibles

mutés pour la ligase IV (lignée 180BR) : le hasard fit que l'allure des courbes de réparation pour chacune des lignées choisies ne changeait pas. Ainsi, cet article ne montrait pas de lignée de radiosensibilité intermédiaire ni de courbes de réparation d'allure variée. Il apparut en effet dès 2003 dans notre laboratoire que les cellules de radiosensibilité intermédiaire étaient caractérisées un taux de CDB plus faible que les 40 CDB induites par Gy attendues immédiatement après irradiation. Ce changement modifiait donc les allures de courbes en les faisant se rapprocher de la fonction Gamma plutôt que des exponentielles biphasiques décroissantes (43) . Il restait donc à expliquer cette double différence : très peu de radiobiologistes s'intéressèrent à cette question, probablement car le recrutement de patients de radiosensibilité intermédiaire passait par des essais cliniques en radiothérapie plutôt que par des prélèvements organisés en génétique. C'était l'objet de la collection COPERNIC.

Enfin, pour renforcer encore l'importance des cas de radiosensibilités intermédiaires dans notre compréhension des phénomènes radiobiologiques, nous avons commencé à explorer dans la revue C la question des effets de répétitions de dose (autrement dit l'effet du fractionnement). Là encore, les cas de radiosensibilités intermédiaires apparaissaient comme les plus à risque et présentant le plus large spectre de réponses aux radiations fractionnées (revue C).

6.2 Un modèle basé sur le transit d'ATM

6.2.1 ATM, protéine nucléaire ou cytoplasmiques ?

Ainsi, en début de thèse, le paradigme communément admis pour expliquer la réponse aux radiations était basé sur la prédominance des événements induits dans le noyau cellulaire et sur le fait que la protéine ATM était considérée comme essentiellement nucléaire. Encore une fois, cette affirmation n'expliquait pas la radiosensibilité des syndromes causés par des mutations de protéines cytoplasmiques révélée dans la revue de Deschavanne et Fertil (147). Cette thèse nous montre que c'est le cas pour :

- la chorée de Huntington (Articles I, II, et chapitre d'ouvrage),

- la neurofibromatose de type I (Article III)
- la tubéreuse de Bourneville (Article IV)
- le syndrome progéroïde de Hutchinson-Gilford (Article V).

De plus, il faut souligner tout de même que l'affirmation de la localisation nucléaire exclusive d'ATM n'a pas été documentée par de solides observations car l'utilisation des extraits protéiques totaux, plus faciles à obtenir, était généralement préférée aux extraits des fractions cytoplasmiques et nucléaires pris séparément. Pourtant, la présence d'ATM dans le cytoplasme avait déjà été démontrée dans d'autres études (46,274,275). Enfin, un traitement de statines et de biphosphonates (ZOPRA) s'est avéré stimulant pour le transit cyto-nucléaire d'ATM, augmentant aussi la radiorésistance et suggérant, encore une fois, que le transit d'ATM est nécessaire pour une réponse radioinduite normale (227).

Enfin, ATM présente également des formes nucléaires. Cependant, ces formes dans les syndromes de groupe II devraient être négligeables ou inefficaces dans la réponse aux radiations. Des simulations numériques en cours nous renforcent dans cette hypothèse. D'ailleurs, les images obtenues par immunofluorescence avec des anticorps anti-pATM montrent systématiquement une plus grande quantité de pATM dans le cytoplasme que dans le noyau.

6.2.2 Le transit d'ATM, une question de dynamique

En plus des questions sur la localisation d'ATM, la théorie du transit a été construite sur une dynamique de diffusion de la protéine ATM dont les preuves expérimentales nécessitaient la manipulation ou l'analyse de formes protéiques cytoplasmiques et nucléaires après irradiation. Ainsi, en plus de l'immunofluorescence, nous avons donc dû utiliser systématiquement des immunoblots et des immunoprécipitations. À notre grande surprise, aucun équivalent n'a été publié dans la littérature.

6.2.3 Le transit d'ATM : l'importance de l'accumulation de données

Enfin, à l'encontre des paradigmes actuels, il nous fallait documenter le plus possible la réalité du transit d'ATM après irradiation. Tout au long des 14 années d'analyses de la radiosensibilité, plus de 200 cas ont été inclus dans la collection COPERNIC. Le laboratoire a ainsi observé que les fibroblastes d'une grande majorité de patients de groupe II montraient systématiquement un retard du transit d'ATM. Il était donc

plausible que la majorité de ces patients pussent souffrir de mutations de protéines X. On estime aujourd'hui que les patients du groupe II représentent 5 à 20% de la population générale. Cette hypothèse, si elle était vérifiée, conduirait alors à la question suivante : l'incidence de tous les syndromes concernés par des mutations de protéines X (groupe II) peut-elle atteindre 5 à 20 % ?

Une analyse rapide de la littérature montre que les syndromes cités plus haut possèdent des caractéristiques communes :

- Les mutations sont hétérozygotes et leur incidence varie entre 1/1000 et 1/10000
- Ces protéines sont essentiellement cytoplasmiques ou péri-nucléaires.

De façon intéressante, il existe d'autres syndromes encore plus connus qui montrent le même tableau : la figure 30 en donne quelques exemples :

- Les mutations de BRCA1 (syndrome familial de cancer du sein et du cancer du sein+ovaire),
- Les mutations de BRCA2 (syndrome familial de cancer de l'ovaire et du cancer du sein mâle),
- Les mutations de p53 (syndrome de Li-Fraumeni)
- Les mutations de Rb (syndrome du retinoblastome familial)

Ces syndromes ont en plus des points communs supplémentaires :

- Les protéines mutées sont des substrats connus d'ATM (à ce jour, l'interaction entre ATM et la huntingtine, la neurofibromine, la tubérine et la progérine n'avait jamais été démontrée formellement chez l'homme)
- Ces mutations entrainent une surexpression des protéines (là encore, cette propriété n'était encore démontrée pour les 4 protéines précitées)
- Ce sont des suppresseurs de tumeurs (seules la neurofibromine et la tubérine peuvent être considérées comme telles ; toutefois, les patients atteints de la chorée de Huntington ou du syndrome progéroïde de Hutchinson-Gilford ont une durée de vie trop limitée pour pouvoir éventuellement observer une mortalité liée à des tumeurs).

Les propriétés communes aux protéines X s'accumulaient ainsi : afin de résoudre la question de la prédiction des radiosensibilités intermédiaires, il était donc nécessaire de s'interroger sur :

- **les interactions possibles entre ATM et les protéines mutées responsables des syndromes**
- **la surexpression des protéines au niveau cytoplasmique**
- **un transit d'ATM retardé.**

6.3 Les protéines X

6.3.3 Premières définitions

Les articles I à VIII montrent que certaines protéines mutées, généralement à l'état hétérozygote (le syndrome progéroïde de Hutchinson-Gilford est causé par une mutation *de novo*), et surexprimées dans le cytoplasme peuvent retarder le transit cyto-nucléaire radioinduit d'ATM. Le retard de ce transit entraîne une radiosensibilité de groupe II et généralement une forte prédisposition au cancer.

La huntingtine, la neurofibromine, la tubérine et la progérine, faisant désormais partie de la liste des protéines X, peuvent être classées en 3 catégories suivant leurs fonctions biologiques déjà documentées ou la façon dont elles interagissent avec ATM :

- **Les « néo-substrats »** : ces protéines deviennent *par leur mutation* substrat d'ATM. Par exemple, la mutation de la huntingtine conduit à l'extension de son domaine polyQ terminal où ATM peut alors se fixer. Il faut cependant noter que la probabilité qu'une mutation produise des sites de fixation (ou de phosphorylation) d'ATM devrait être faible. Toutes les maladies génétiques à répétitions de trinucléotides sont potentiellement concernées (ex : ataxie de Freidriech, ataxie spino-cérébelleuse, syndrome de l'X fraqile, …). L'incidence de ces maladies génétiques est de l'ordre de 1/10000. De façon intéressante, ces maladies sont toutes des syndromes de neurodégénérescence.

- **Les « substrats »** : ces protéines sont déjà décrites comme interagissant avec ATM dans le cytoplasme. De plus, leur mutation entraîne une surexpression de la protéine dans le cytoplasme. Dans nos calculs numériques de l'article (278) nous avons estimé que le cytoplasme était un réservoir de l'ordre de 10^7 à 10^8 protéines ATM. Il suffirait d'une surexpression de 1,5 à 2 fois plus élevée que celle d'ATM pour la séquestrer significativement (données internes au laboratoire). Les protéines BRCA1, BRCA2, p53 et Rb appartiennent à cette catégorie. De façon intéressante, toutes ces protéines sont des suppresseurs de tumeur et leur incidence sont de l'ordre de 1/500 à 1/5000.

- **Les « protéines du nucleosquelette » :** le seule exemple pour l'instant est la progérine. Contrairement aux 2 catégories précédentes, la mutation de ces protéines X n'aurait pas forcément des conséquences au niveau du cytoplasme mais plutôt au niveau des pores : le transit d'ATM serait ainsi retardé non pas par une séquestration d'ATM dans le cytoplasme mais plutôt par un encombrement stérique au niveau du pore (extrémité nucléaire pour la progérine). Il faut noter que la progérine est un substrat d'ATM très probable chez l'homme (déjà montré chez la souris et in silico chez l'homme) et que ses mutations entrainent aussi un syndrome neurodégénératif.

6.3.2 Protéines X et groupe II : a-t-on recensé tous les cas ?

Toujours en s'aidant de la figure 17 mais cette fois en la complétant par les données de thèse, nous proposons alors une vision nouvelle de la radiosensibilité intermédiaire (groupe II) avec :

- Des syndromes plutôt associés à des dysfonctions du nucleosquelette, montrant une très forte radiosensibilité mais une incidence très faible (ex : le syndrome progéroïde de Hutchinson-Gilford)
- Des syndromes plutôt associés à une neurodégénérescence montrant une radiosensibilité de forte à intermédiaire avec une incidence inférieure à 1/1000 (ex : la chorée de Huntington)
- Des syndromes de prédisposition au cancer associés à une faible radiosensibilité mais une incidence importante (supérieure à 1/5000) (ex : mutations de BRCA1). Ce sont ces syndromes que l'on peut rencontrer en radiothérapie. (Figure 52)

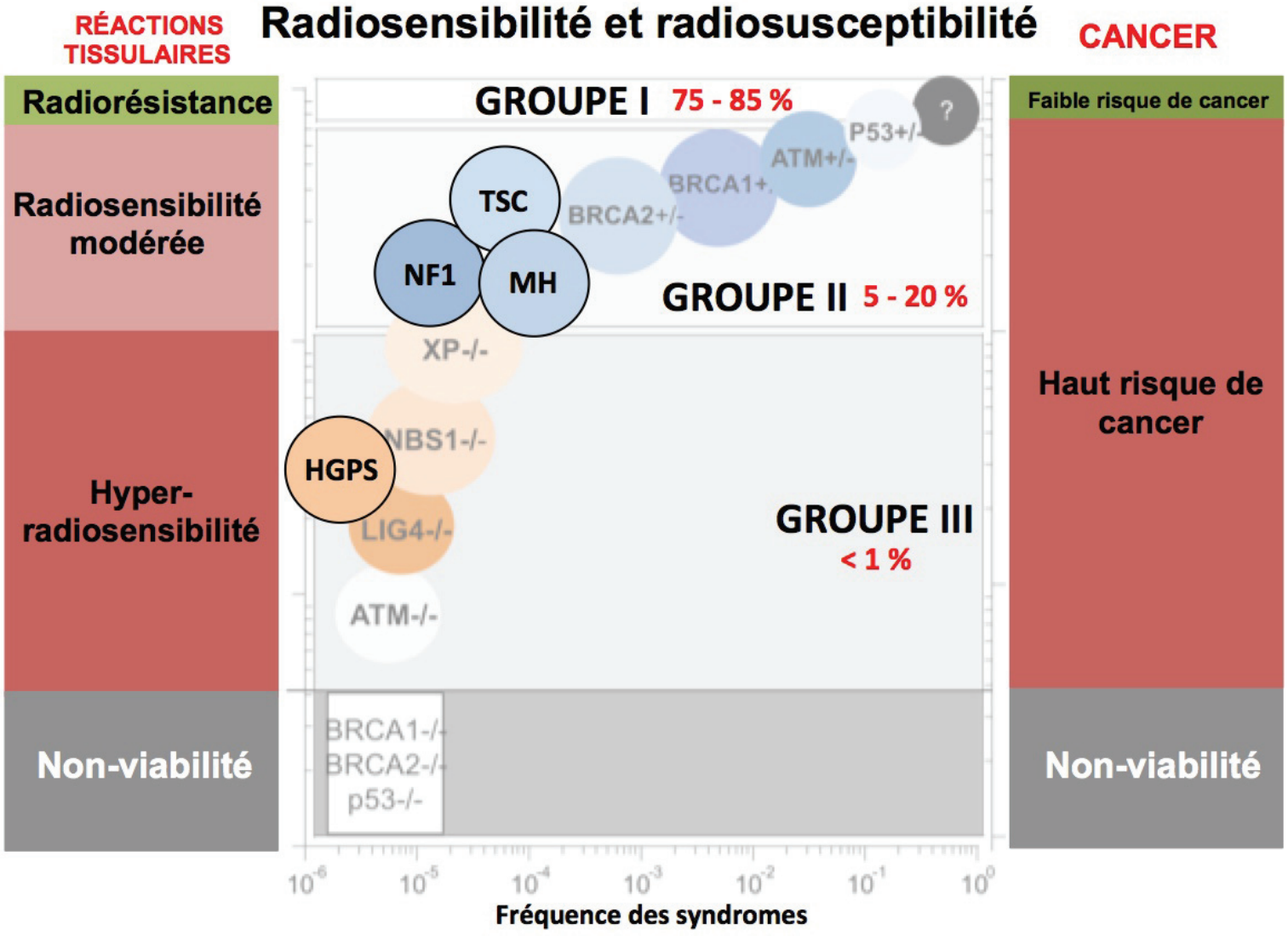


Figure 52 : *Modification de la figure 17 en intégrant les nouveaux syndromes étudiés*

En sommant toutes les incidences de ces syndromes, obtient-on les 5 à 20% d'individus appartenant au groupe II ? Même si les porteurs de mutations hétérozygotes d'ATM représentent 1% de la population, il est difficile d'imaginer que la somme de toutes les incidences aboutit à cette estimation : faut-il alors émettre l'hypothèse d'une *masse manquante* qui représenterait la majorité des cas de groupe II ? En éliminant la possibilité d'autres syndromes génétiques prédisposant au cancer ou bien des maladies du nucléosquelette non encore décrits, on pourrait supposer qu'une sous-population non négligeable porte des mutations hétérozygotes sur des séquences codantes du génome voire de simples polymorphismes qui conduiraient à des protéines pouvant séquestrer ATM dans le cytoplasme. La probabilité de ces événements pourrait être très grande puisqu'ici, elle ne concernerait pas une protéine en particulier mais un ensemble de protéines variées conduisant à des neo-substrats d'ATM. De nouvelles investigations sont donc nécessaires pour répondre à cette question. Si nos hypothèses se confirment, elles suggéreraient un système de prédiction à 2 vitesses :

- Le premier, réalisé sur une base de test génomique, sur des cellules non-irradiées, à n'importe quel moment de la vie, qui consisterait à détecter un certain taux de remaniements aboutissant à la production de protéines X. On définirait alors l'état de groupe II.
- Le second, réalisé avant une radiothérapie, basé sur des tests fonctionnels de la signalisation (transit d'ATM) sur des cellules irradiées mimant le traitement pour détecter les personnes à risques de réactions secondaires. On définirait alors l'état de groupe II à risque de réactions tissulaires de radiosensibilité. D'ailleurs cette deuxième étape pourrait s'appliquer aussi pour estimer le risque à l'exposition de n'importe quel génotoxique (voir plus loin). De plus, on peut également envisager 2 sous-étapes avec des tests rapides de premier tri et d'autres, plus complets, aboutissant à un diagnostic quasi-génétique. (Figure 53)

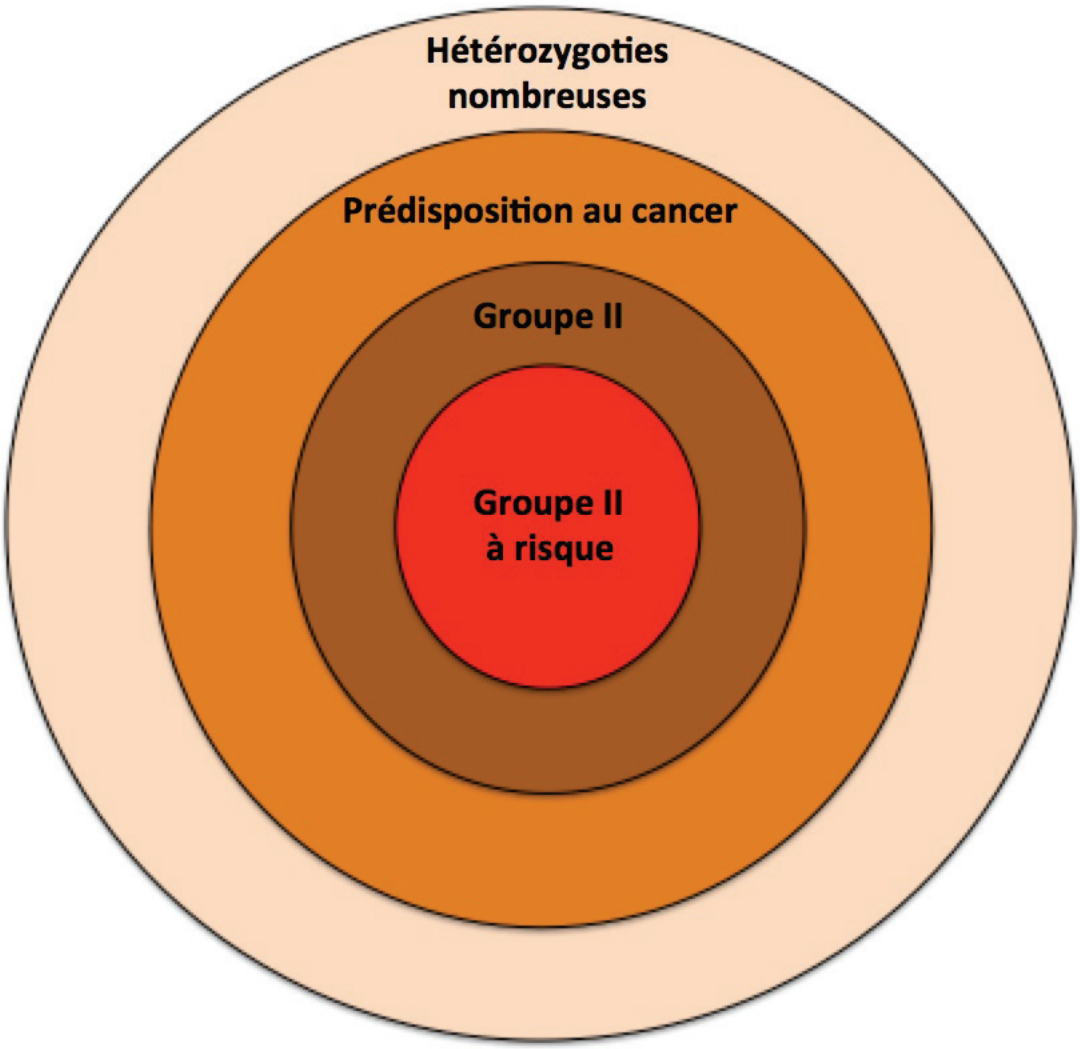


Figure 53 : *Représentation schématique des statuts à risque. Dans la population générale on observe un grand nombre d'hétérozygotie qui pourrait être signe d'instabilité génomique que l'on retrouve dans les patients de groupe II. Des phénotypes variés sont exprimés dans le groupe II, notamment des patients radiosensibles pouvant poser des problèmes en radiothérapie.*

6.4 Notions de pro- et d'anti-épiskévie

Un des paradigmes les plus répandus de la radiobiologie était la nécessité de *diminuer l'oxydation pour diminuer le nombre de dommages de l'ADN* (317). Ainsi, pour radioprotéger, il fallait provoquer une réduction chimique. Toutefois, on voit bien que pour des cellules de groupe II voire de groupe III, le fait de diminuer le nombre de CDB n'a pas forcément d'effet sur le rendement de reconnaissance ni sur le rendement de réparation : si l'on agit sur le transit d'ATM, c'est toute la réparation des CDB qui est *stimulée*. Un exemple représentatif a été donné avec des statines associées à des biphosphonates à travers la caractérisation radiobiologique de la chorée de Huntington (Articles I et II), de la neurofibromatose (Article III), de la tubéreuse de Bourneville (Article IV) et du syndrome progéroïde de Hutchinson-Gilford (Article V). On y voit que cette combinaison de drogue agit sur le retard du transit d'ATM et augmente la radiorésistance. Le zolédronate est connu pour son rôle inhibiteur de la farnésylation des membranes, la pravastatine est un anti-cholestérolémiant. Combinées, ces drogues apparaissent comme *stimulatrices de la réparation*.

Nous proposons un nouveau terme pour décrire cette propriété : issue du grec épiskeuê, (réparation) tout agent ou condition accélérant le transit d'ATM seront dénommés *pro-épiskéviques.* Par opposition, tout agent ou condition ralentissant le transit d'ATM seront dénommés anti-*épiskévique*s.

6.5 Action anti-épiskévique des métaux et pesticides

Après avoir étudié des exemples de ralentissement du transit d'ATM causés par des protéines mutées surexprimées dans le cytoplasme, nous nous sommes intéressés à l'action pro- ou anti-épiskévique d'agents chimiques. Soucieux d'appliquer nos travaux à des cas pratiques et d'intérêt sociétal, l'exemple des métaux et des pesticides apparut comme le plus pertinent.

6.5.1 Les métaux

Dans l'article VI, nous avons accumulé des données pour 13 espèces métalliques représentant 10 métaux différents, ce qui en fait une étude inédite permettant la comparaison des effets biologiques d'une large gamme d'agents génotoxiques. Le

premier résultat important est évidemment que la présence de métal induit des CDB. Toutefois, deux autres observations devaient être mises en exergue :

- la forme des cinétiques d'apparition des foci γH2AX suggérant un excès d'induction de CDB pour les plus hautes concentrations testées.
- l'équivalent du phénomène d'hypersensibilité aux faibles doses (HRS), historiquement décrit avec des radiations (1.4) observé pour certains métaux comme le cuivre et l'aluminium (Article VI) et suggérant une implication directe du transit d'ATM.

Un modèle général a pu être proposé pour décrire l'action génotoxique des métaux :

- La présence d'espèces métalliques dans le milieu biologique favorise son oxydation par des réactions dites Fenton-like qui aboutissent à la production de peroxyde d'hydrogène. Cette oxydation contribue dans le noyau à la formation de CSB et de CDB. Cette induction de CDB devient significative à partir d'une concentration-seuil spécifique.
- Des concentrations plus élevées pourraient réduire la vitesse de transit d'ATM et donc empêcher toute reconnaissance ou réparation. Cette inhibition de la réparation des CDB devient significative au-delà de concentrations-seuils spécifiques. Toutefois le mode opératoire de cette action reste à préciser. Il est possible que les métaux puissent se fixer à ATM et à empêcher, non plus mécaniquement mais électriquement, le passage de la protéine à travers la membrane nucléaire.
- A des concentrations plus faibles, la faible production de monomères d'ATM conduirait au phénomène HRS pour les mêmes raisons que pour les radiations.

Il apparait donc que, à des degrés divers, les métaux testés peuvent être considérés comme des agents anti-épiskéviques. Nos données obtenues permettent de documenter les propriétés radiosensibilisantes de certains métaux : la détermination des concentrations-seuils de production de CDB et d'inhibition de réparation rend possible une description complète de la génotoxicité du métal (Figure 54).

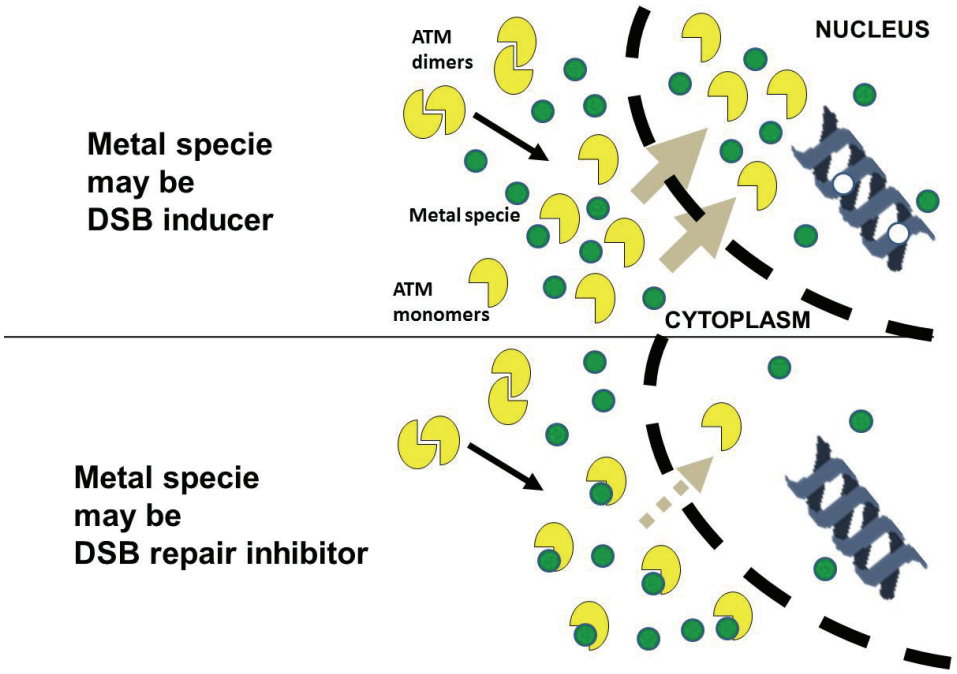


Figure 54 : *Modèle du transit d'ATM appliquée aux métaux. Les métaux peuvent produire oxydation, monomérisation d'ATM et cassures. A plus fortes concentrations ou pour d'autres métaux, ils peuvent s'associer à ATM et ralentir le transit.*

6.5.2 Les pesticides

Pendant la période de thèse, le laboratoire d'accueil a obtenu des financements pour l'étude des effets biologiques de pesticides d'intérêts domestiques et environnementaux (PIDE) tels que : l'atrazine, le glyphosate, la perméthrine, et le pentachlorophénol (Tableau 2). De façon inégale, ces PIDEs sont soit inducteurs de CDB, soit inhibiteurs de la réparation (anti-épiskéviques), soit possèdent les deux propriétés. Les résultats obtenus dans cette thèse représentent des expériences préliminaires à un projet de plus grande ampleur. Toutefois, cette thèse aura initié une nouvelle caractérisation fonctionnelle des PIDEs qui nous permet aujourd'hui de mieux comprendre les effets cocktails. En effet, à la suite de l'analyse des données sur les métaux et les PIDEs, on comprend mieux comment l'association d'un métal et d'un pesticide peut engendrer un effet biologique délétère, notamment si l'un est fortement inducteur de CDB et l'autre inhibiteur de leur réparation. La théorie du transit d'ATM aura ainsi contribué à bâtir une méthode d'analyse de la toxicologie valable pour n'importe quel agent cassant.

Pesticides	Classe chimique	Usages	Toxicité connue chez l'homme
Atrazine	Triazine	Herbicide	Tératogène possible, prostate, sein
Glyphosate	Organophosphate	Herbicide	Très controversée
Permethrine	Pyréthrinoïde	Insecticide	Faible
Pentachlorophénol	Organochloré	Insecticide et herbicide	Tératogène possible, carcinogène (Groupe 2B IARC classification), Toxicité vasculaire et cérébrale

Tableau 2 : *Récapitulatif des pesticides étudiés, de leurs usages principaux et de leur toxicité connue. Inspiré de https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov*

CONCLUSIONS – PERSPECTIVES

L'approche générale du laboratoire d'accueil est de mieux comprendre les effets biologiques de la réponse aux radiations pour en tirer des moyens de prédiction de la radiosensibilité. En ce sens, cette thèse a contribué à définir des notions nouvelles (anti- et pro-épiskévie) directement issues de la théorie du transit d'ATM. De plus, elle a contribué à mettre en place :

- une liste de protéines (appelées X) modulant la réponse aux radiations ionisantes et de syndromes génétiques à risque. Cette approche nous permet aujourd'hui une meilleure prise en charge des patients n'étant pas forcément considérés comme radiosensibles. Un projet clinique spécifique à la neurofibromatose de type I a d'ailleurs démarré pendant la thèse.

- une liste d'agents chimiques modulant aussi la réponse aux radiations de manière pro-épiskévique (ex statines) soit de manière anti-épiskévique (ex : métaux et pesticides).

Un modèle très général se met donc en place où l'unité de risque serait les cassures double-brin de l'ADN non-réparées et où un transit rapide d'ATM serait l'une des conditions majeures à l'absence de risque.

BIBLIOGRAPHIE

1. Lea DE. Actions of radiations on living cells. London: Cambridge University Press; 1946.
2. Kellerer AM, Rossi HH. The theory of dual radiation action. *Current Topics in Radiation Research* 1972;8:85-158.
3. Chadwick KH, Leenhouts HP. A molecular theory of cell survival. *Physics Medicine Biology* 1973;13:78-87.
4. Tubiana M, Dutreix J, Wambersie A. Radiobiologie. Paris: Hermann; 1986.
5. Ward JF. Biochemistry of DNA lesions. *Radiation research* 1985;8:S103-111.
6. Evans RD. The atomic nucleus. USA: Malabar, FL: Krieger Publishing; 1985.
7. Krebs AT. Bubble chamber pictures as a means of demonstrating radiation distribution in biological systems. *Radiology* 1970;96:635-638.
8. Buffon GLLd. Solution de problèmes sur le jeu du franc-carreau. Mémoire présenté à l'académie royale des sciences. In essai d'arithmétique morale, histoire naturelle, générale et particulière, Paris: Imprimerie Royale; 1733.
9. Metropolis N, Ulam S. The monte-carlo method. *Journal of the American Statistical Association* 1949;44:335-341.
10. Smith R. Ude of the monte-carlo simulation fro human exposure assessment at a superfund site. *Risk Analysis* 1994;14:433-439.
11. Paretzke HG. Radiation track structure theory. In: Freeman GR, editor Kinetics of nonhomogenous processes. New York, USA: Wileys and Sons; 1987. pp. 89-170.
12. Nikjoo H, Goodhead DT, Charlton DE, Paretzke HG. Energy deposition in small cylindrical targets by ultrasoft x-rays. *Physics in medicine and biology* 1989;34:691-705.
13. Goodhead DT. The initial physical damage produced by ionizing radiations. *International journal of radiation biology* 1989;56:623-634.
14. Goodhead DT, Nikjoo H. Track structure analysis of ultrasoft x-rays compared to high- and low-let radiations. *International journal of radiation biology* 1989;55:513-529.
15. Goodhead DT. Spatial and temporal distribution of energy. *Health physics* 1988;55:231-240.

16. Goodhead DT, Thacker J, Cox R. Weiss lecture. Effects of radiations of different qualities on cells: Molecular mechanisms of damage and repair. *International journal of radiation biology* 1993;63:543-556.
17. Siddiqi MA, Bothe E. Single- and double-strand break formation in DNA irradiated in aqueous solution: Dependence on dose and oh radical scavenger concentration. *Radiation research* 1987;112:449-463.
18. Fielden EM, O'Neill P. The early effects of radiation on DNA. Berlin: Springer; 1991.
19. Hall EJ, Giacca AJ. Radiobiology for the radiologist. Philadelphia, USA: Lippincott Wilkins & Williams; 2006.
20. Tubiana M. Radiobiologie. Radiothérapie et radioprotection. Bases fondamentales. Paris: Hermann/Médecine; 2008.
21. Daniels M, Wigg E. Oxygen as a primary species in radiolysis of water. *Science* 1966;153:1533-1534.
22. Jonah CD. A short history of the radiation chemistry of water. *Radiation research* 1995;144:141-147.
23. Gastaldo J, Bencokova Z, Massart C, Joubert A, Balosso J, Charvet AM, Foray N. Specific molecular and cellular events induced by irradiated x-ray photoactivatable drugs raise the problem of co-toxicities: Particular consequences for anti-cancer synchrotron therapy. *Journal of Synchrotron Radiation* 2011;18:456-463.
24. Joubert A, Biston MC, Boudou C, Ravanat JL, Brochard T, Charvet AM, Esteve F, Balosso J, Foray N. Irradiation in presence of iodinated contrast agent results in radiosensitization of endothelial cells: Consequences for computed tomography therapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2005;62:1486-1496.
25. Michaelis L, Menten ML. Die kinetik der invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift* 1913;49:333-369.
26. Cornish-Bowden A. Fundamentals of enzyme kinetics. London: Portland; 1995.
27. Morrison C, Smith GC, Stingl L, Jackson SP, Wagner EF, Wang ZQ. Genetic interaction between parp and DNA-pk in v(d)j recombination and tumorigenesis. *Nature Genetics* 1997;17:479-482.
28. Breen AP, Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radical Biolology in Medicine* 1995;18:1033-1077.
29. Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget JP, Ravanat JL, Sauvaigo S. Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutation research* 1999;424:9-21.

30. Moustacchi E. DNA damage and repair: Consequences on dose-responses. *Mutat research* 2000;464:35-40.
31. Lindahl T, Wood RD. Quality control by DNA repair. *Science* 1999;286:1897-1905.
32. Ward JF. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: Identities, mechanisms of formation, and reparability. *Progress in nucleic acid research in molecular biology* 1988;35:95-125.
33. Frankenberg-Schwager M. Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells in vitro by ionizing radiation. *Radiotherapy and oncology* 1989;14:307-320.
34. Foray N, Monroco C, Marples B, Hendry JH, Fertil B, Goodhead DT, Arlett CF, Malaise EP. 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;74:551-560.
35. Schneeweiss FH, Tisljar-Lentulis G, Haustein K, Feinendegen LE. 'Periodical' pattern of kinetics of DNA strand break repair following gamma-irradiation of human t1-cells. *International journal of radiation biology* 1987;52:491-493.
36. Steel G. Basic clinical radiobiology, 3rd ed. London: Arnold Publishers; 1993.
37. Iliakis G. The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. *Bioessays* 1991;13:641-648.
38. Badie C, Iliakis G, Foray N, Alsbeih G, Cedervall B, Chavaudra N, Pantelias G, Arlett C, Malaise EP. 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;144:26-35.
39. 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. *International journal of radiation biology* 1997;72:271-283.
40. Badie C, Iliakis G, Foray N, Alsbeih G, Pantellias GE, Okayasu R, Cheong N, Russell NS, Begg AC, Arlett CF, et al. Defective repair of DNA double-strand breaks and chromosome damage in fibroblasts from a radiosensitive leukemia patient. *Cancer research* 1995;55:1232-1234.
41. Allalunis-Turner MJ, Barron GM, Day RS, 3rd, Dobler KD, Mirzayans R. Isolation of two cell lines from a human malignant glioma specimen differing in sensitivity to radiation and chemotherapeutic drugs. *Radiation research* 1993;134:349-354.

42. Foray N, Randrianarison V, Marot D, Perricaudet M, Lenoir G, Feunteun J. Gamma-rays-induced death of human cells carrying mutations of brca1 or brca2. *Oncogene* 1999;18:7334-7342.
43. Joubert A, Zimmerman KM, 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.
44. Foray N, Verrelle P. [DNA repair and repair diseases: Between molecular models and clinical reality]. *Bulletin du cancer* 2011;98:257-275.
45. 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.
46. 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. *Journal of theoretical biology* 2013;333:135-145.
47. Ager DD, Dewey WC. Calibration of pulsed field gel electrophoresis for measurement of DNA double-strand breaks. *International journal of radiation biology* 1990;58:249-259.
48. Iliakis G, Pantelias GE, Okayasu R, Seaner R. 125idurd-induced chromosome fragments, assayed by premature chromosome condensation, and DNA double-strand breaks have similar repair kinetics in g1-phase cho-cells. *International journal of radiation biology* 1987;52:705-722.
49. Granzotto A, Joubert A, Viau M, Devic C, Maalouf M, Thomas C, Vogin G, Malek K, Colin C, Balosso J, Foray N. Individual response to ionising radiation : What predictive assay(s) to choose? *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 2011;334:140-157.
50. Lehmann AR, Ormerod MG. Double-strand breaks in the DNA of a mammalian cell after x-irradiation. *Biochimica et biophysica acta* 1970;217:268-277.
51. Okayasu R, Iliakis G. Linear DNA elution dose response curves obtained in cho cells with non-unwinding filter elution after appropriate selection of the lysis conditions. *International journal of radiation biology* 1989;55:569-581.

52. Cedervall B, Wong R, Albright N, Dynlacht J, Lambin P, Dewey WC. Methods for the quantification of DNA double-strand breaks determined from the distribution of DNA fragment sizes measured by pulsed-field gel electrophoresis. *Radiation research* 1995;143:8-16.
53. Roti Roti JL, Wright WD. Visualization of DNA loops in nucleoids from hela cells: Assays for DNA damage repair. *Cytometry* 1987;8:461-467.
54. Olive PL. Impact of the comet assay in radiobiology. *Mutation research* 2009;681:13-23.
55. 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.
56. 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;83:543-549.
57. Radford IR, Hodgson GS. 125i-induced DNA double strand breaks: Use in calibration of the neutral filter elution technique and comparison with x-ray induced breaks. *International journal of radiation biology* 1985;48:555-566.
58. 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.
59. Joubert A, Foray N. [intrinsic radiosensitivity and DNA double-strand breaks in human cells]. *Cancer radiotherapie* 2007;11:129-142.
60. 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 journal* 2003;22:2860-2871.
61. Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: Putting checkpoints in perspective. *Nature* 2000;408:433-439.
62. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: Signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics* 2001;27:247-254.
63. Shiloh Y. Atm and atr: Networking cellular responses to DNA damage. *Current Opinion in Genetics and Development* 2001;11:71-77.
64. Smith GC, Jackson SP. The DNA-dependent protein kinase. *Genes & development* 1999;13:916-934.

65. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone h2ax phosphorylation on serine 139. *Journal of biological chemistry* 1998;273:5858-5868.
66. Brown EJ, Baltimore D. Essential and dispensable roles of atr in cell cycle arrest and genome maintenance. *Genes & development* 2003;17:615-628.
67. Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. Atm phosphorylates histone h2ax in response to DNA double-strand breaks. *Journal of biological chemistry* 2001;276:42462-42467.
68. Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 1999;146:905-916.
69. Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG, Bonner WM. Quantitative detection of (125)idu-induced DNA double-strand breaks with gamma-h2ax antibody. *Radiation research* 2002;158:486-492.
70. Thyagarajan B, McCormick-Graham M, Romero DP, Campbell C. Characterization of homologous DNA recombination activity in normal and immortal mammalian cells. *Nucleic acids research* 1996;24:4084-4091.
71. Ehrlich SD, Bierne H, d'Alencon E, Vilette D, Petranovic M, Noirot P, Michel B. Mechanisms of illegitimate recombination. *Gene* 1993;135:161-166.
72. Wu L, Davies SL, Levitt NC, Hickson ID. Potential role for the blm helicase in recombinational repair via a conserved interaction with rad51. *Journal of biological chemistry* 2001;276:19375-19381.
73. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998;396:643-649.
74. Zhou ZH, Akgun E, Jasin M. Repeat expansion by homologous recombination in the mouse germ line at palindromic sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98:8326-8333.
75. Walker JR, Corpina RA, Goldberg J. Structure of the ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* 2001;412:607-614.
76. Dai Y, Kysela B, Hanakahi LA, Manolis K, Riballo E, Stumm M, Harville TO, West SC, Oettinger MA, Jeggo PA. Nonhomologous end joining and v(d)j recombination require an additional factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100:2462-2467.

77. Joubert A, Foray N. Repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in human cells: History, progress and controversies. In: Landseer BR, editor In: New research on DNA repair: Nova Science Publishers, Inc; 2006.
78. Foray N, Charvet AM, Duchemin D, Favaudon V, Lavalette D. The repair rate of radiation-induced DNA damage: A stochastic interpretation based on the gamma function. *Journal of theoretical biology* 2005;236:448-458.
79. Goodhead DT. Saturable repair models of radiation action in mammalian cells. *Radiation research* 1985;8:S58-67.
80. Rothkamm K, Kruger I, Thompson LH, Lobrich M. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Molecular and Cellular Biology* 2003;23:5706-5715.
81. Foray N, Fertil B, Alsbeih MG, Badie C, Chavaudra N, Iliakis G, Malaise EP. Dose-rate effect on radiation-induced DNA double-strand breaks in the human fibroblast hf19 cell line. *International journal of radiation biology* 1996;69:241-249.
82. Radivoyevitch T, Hoel DG, Hahnfeldt PJ, Rydberg B, Sachs RK. Recent data obtained by pulsed-field gel electrophoresis suggest two types of double-strand breaks. *Radiation research* 1998;149:52-58.
83. Curtis SB. Lethal and potentially lethal lesions induced by radiation--a unified repair model. *Radiation research* 1986;106:252-270.
84. Sontag W. A discrete cell survival model including repair after high dose-rate of ionizing radiation. *International journal of radiation biology* 1997;71:129-144.
85. Tobias CA. The repair-misrepair model in radiobiology: Comparison to other models. *Radiation research* 1985;8:S77-95.
86. Cucinotta FA, Nikjoo H, O'Neill P, Goodhead DT. Kinetics of dsb rejoining and formation of simple chromosome exchange aberrations. *International journal of radiation biology* 2000;76:1463-1474.
87. Stewart RD. Two-lesion kinetic model of double-strand break rejoining and cell killing. *Radiation research* 2001;156:365-378.
88. Ostashevsky JY. A model relating cell survival to DNA fragment loss and unrepaired double-strand breaks. *Radiation research* 1989;118:437-466.
89. Kysela BP, Michael BD, Arrand JE. Relative contributions of levels of initial DNA damage and repair of double strand breaks to the ionizing radiation-sensitive phenotype of the chinese hamster cell mutant, xr-v15b. Part i. X-rays. *International journal of radiation biology* 1993;63:609-616.

90. Foray N, Badie C, Alsbeih G, Fertil B, Malaise EP. A new model describing the curves for repair of both DNA double-strand breaks and chromosome damage. *Radiation research* 1996;146:53-60.
91. Segel IH. Enzyme kinetics. New York: Wiley; 1975.
92. Iliakis G, Mehta R, Jackson M. Level of DNA double-strand break rejoining in chinese hamster xrs-5 cells is dose-dependent: Implications for the mechanism of radiosensitivity. *International journal of radiation biology* 1992;61:315-321.
93. Fowler JF. Is repair of DNA strand break damage from ionizing radiation second-order rather than first-order? A simpler explanation of apparently multiexponential repair. *Radiation research* 1999;152:124-136.
94. Savitsky K, Sfez S, Tagle DA, Ziv Y, Sartiel A, Collins FS, Shiloh Y, Rotman G. The complete sequence of the coding region of the atm gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. *Human molecular genetics* 1995;4:2025-2032.
95. Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates atm through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 2003;421:499-506.
96. Zhao S, Weng YC, Yuan SS, Lin YT, Hsu HC, Lin SC, Gerbino E, Song MH, Zdzienicka MZ, Gatti RA, Shay JW, Ziv Y, Shiloh Y, Lee EY. Functional link between ataxia-telangiectasia and nijmegen breakage syndrome gene products. *Nature* 2000;405:473-477.
97. Lee JH, Paull TT. Direct activation of the atm protein kinase by the mre11/rad50/nbs1 complex. *Science* 2004;304:93-96.
98. Watters D, Khanna KK, Beamish H, Birrell G, Spring K, Kedar P, Gatei M, Stenzel D, Hobson K, Kozlov S, Zhang N, Farrell A, Ramsay J, Gatti R, Lavin M. Cellular localisation of the ataxia-telangiectasia (atm) gene product and discrimination between mutated and normal forms. *Oncogene* 1997;14:1911-1921.
99. Brown KD, Ziv Y, Sadanandan SN, Chessa L, Collins FS, Shiloh Y, Tagle DA. The ataxia-telangiectasia gene product, a constitutively expressed nuclear protein that is not up-regulated following genome damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997;94:1840-1845.
100. Barlow C, Ribaut-Barassin C, Zwingman TA, Pope AJ, Brown KD, Owens JW, Larson D, Harrington EA, Haeberle AM, Mariani J, Eckhaus M, Herrup K, Bailly Y, Wynshaw-Boris A. Atm is a cytoplasmic protein in mouse brain required to prevent lysosomal accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97:871-876.

101. Oka A, Takashima S. Expression of the ataxia-telangiectasia gene (atm) product in human cerebellar neurons during development. *Neuroscience letters* 1998;252:195-198.
102. Shiloh Y, Tabor E, Becker Y. Colony-forming ability of ataxia-telangiectasia skin fibroblasts is an indicator of their early senescence and increased demand for growth factors. *Experimental cell research* 1982;140:191-199.
103. Bar RS, Levis WR, Rechler MM, Harrison LC, Siebert C, Podskalny J, Roth J, Muggeo M. Extreme insulin resistance in ataxia telangiectasia: Defect in affinity of insulin receptors. *New England journal of medicine* 1978;298:1164-1171.
104. McKinnon PJ, Burgoyne LA. Altered cellular morphology and microfilament array in ataxia-telangiectasia fibroblasts. *European journal of cell biology* 1985;39:161-166.
105. Ammann AJ, Cain WA, Ishizaka K, Hong R, Good RA. Immunoglobulin e deficiency in ataxia-telangiectasia. *New England journal of medicine* 1969;281:469-472.
106. Rhodes N, D'Souza T, Foster CD, Ziv Y, Kirsch DG, Shiloh Y, Kastan MB, Reinhart PH, Gilmer TM. Defective potassium currents in ataxia telangiectasia fibroblasts. *Genes & development* 1998;12:3686-3692.
107. Young DB, Jonnalagadda J, Gatei M, Jans DA, Meyn S, Khanna KK. Identification of domains of ataxia-telangiectasia mutated required for nuclear localization and chromatin association. *Journal of biological chemistry* 2005;280:27587-27594.
108. Fick A. Uber diffusion. *Annalen der Physik* 1855;170:59-86.
109. Einstein A. Investigations on the theory of the brownian movement, edited with notes by r. FürthNew York, USA: Dover publications; 1956.
110. Sten-Knudsen O. Biological membranes : Theory of transport, potentials and electric impulses. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2007.
111. Johnson RT, Rao PN. Mammalian cell fusion: Induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature* 1970;226:717-722.
112. Cornforth MN, Bedford JS. High-resolution measurement of breaks in prematurely condensed chromosomes by differential staining. *Chromosoma* 1983;88:315-318.
113. Bedford JS, Cornforth MN. Relationship between the recovery from sublethal x-ray damage and the rejoining of chromosome breaks in normal human fibroblasts. *Radiation research* 1987;111:406-423.

114. Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986;83:2934-2938.
115. Simi S, Xiao Y, Campagna M, Doehmer J, Darroudi F. Dual-colour fish analysis to characterize a marker chromosome in cytochrome p450 2b1 recombinant v79 chinese hamster cells. *Mutagenesis* 1999;14:57-61.
116. Sachs RK, Hlatky LR, Trask BJ. Radiation-produced chromosome aberrations: Colourful clues. *Trends in Genetics* 2000;16:143-146.
117. Darroudi F, Fomina J, Meijers M, Natajaran AT. Kinetics of the formation of chromosome aberrations in x-irradiated human lymphocytes, using pcc and fish. *Mutation Research* 1998;404:55-65.
118. Vousden KH, Lane DP. P53 in health and disease. *Nature reviews in Molecular cell biology* 2007;8:275-283.
119. Ekholm SV, Reed SI. Regulation of g(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Current opinion in cell biology* 2000;12:676-684.
120. Luo Y, Hurwitz J, Massague J. Cell-cycle inhibition by independent cdk and pcna binding domains in p21cip1. *Nature* 1995;375:159-161.
121. Busino L, Chiesa M, Draetta GF, Donzelli M. Cdc25a phosphatase: Combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis. *Oncogene* 2004;23:2050-2056.
122. Ando T, Kawabe T, Ohara H, Ducommun B, Itoh M, Okamoto T. Involvement of the interaction between p21 and proliferating cell nuclear antigen for the maintenance of g2/m arrest after DNA damage. *Journal of biological chemistry* 2001;276:42971-42977.
123. Smits VA, Klompmaker R, Vallenius T, Rijksen G, Makela TP, Medema RH. P21 inhibits thr161 phosphorylation of cdc2 to enforce the g2 DNA damage checkpoint. *Journal of biological chemistry* 2000;275:30638-30643.
124. Xu B, Kim S, Kastan MB. Involvement of brca1 in s-phase and g(2)-phase checkpoints after ionizing irradiation. *Molecular and Cellular Biology* 2001;21:3445-3450.
125. Duque-Parra JE. Note on the origin and history of the term "apoptosis". *Anatomical record Part B, New anatomist* 2005;283:2-4.
126. Foray N. [claudius regaud (1870-1940): A pioneer of radiobiology and radiotherapy]. *Cancer radiotherapie* 2012;16:315-321.

127. Puck TT, Marcus PI. Action of x-rays on mammalian cells. *Journal of Experimental Medicine* 1956;103:653-666.
128. Hewitt HB, Wilson CW. A survival curve for mammalian cells irradiated in vivo. *Nature* 1959;183:1060-1061.
129. Fertil B, Malaise EP. Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 1981;7:621-629.
130. Stoddart MJ. Cell viability assays: Introduction. *Methods in molecular biology* 2011;740:1-6.
131. Chaurasia M, Bhatt AN, Das A, Dwarakanath BS, Sharma K. Radiation-induced autophagy: Mechanisms and consequences. *Free radical research* 2016;50:273-290.
132. White E. Entosis: It's a cell-eat-cell world. *Cell* 2007;131:840-842.
133. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation research* 2000;455:81-95.
134. D'Amico AV, McKenna WG. Apoptosis and a re-investigation of the biologic basis for cancer therapy. *Radiotherapy and oncology* 1994;33:3-10.
135. Bursch W, Kleine L, Tenniswood M. The biochemistry of cell death by apoptosis. *Biochemical and Cellular Biology* 1990;68:1071-1074.
136. Walker PR, Kokileva L, LeBlanc J, Sikorska M. Detection of the initial stages of DNA fragmentation in apoptosis. *Biotechniques* 1993;15:1032-1040.
137. Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T. P53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 1993;362:847-849.
138. Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent g1 arrest and long-term induction of cip1 in normal human fibroblasts. *Genes & development* 1994;8:2540-2551.
139. Li CY, Nagasawa H, Dahlberg WK, Little JB. Diminished capacity for p53 in mediating a radiation-induced g1 arrest in established human tumor cell lines. *Oncogene* 1995;11:1885-1892.
140. Roninson IB, Broude EV, Chang BD. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 2001;4:303-313.

141. Shinomiya N. New concepts in radiation-induced apoptosis: 'Premitotic apoptosis' and 'postmitotic apoptosis'. *Journal of cellular and molecular medicine* 2001;5:240-253.
142. Bodgi L, Canet A, Pujo-Menjouet L, Lesne A, Victor JM, Foray N. Mathematical models of radiation action on living cells: From the target theory to the modern approaches. A historical and critical review. *Journal of theoretical biology* 2016;394:93-101.
143. Elkind MM, Whitmore GF. The radiobiology of cultured mammalian cells. New York: Gordon and Breach; 1967.
144. Kellerer AM, Rossi HH. A generalized formulation of dual radiation action. *Radiation research* 1978;75:471-488.
145. 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. *Radiotherapy and oncology* 2004;73:373-382.
146. Little JB. Cellular effects of ionizing radiation. *New England journal of medicine* 1968;278:369-376.
147. Fertil B, Reydellet I, Deschavanne PJ. A benchmark of cell survival models using survival curves for human cells after completion of repair of potentially lethal damage. *Radiation research* 1994;138:61-69.
148. Bender MA, Gooch PC. The kinetics of x-ray survival of mammalian cells in vitro. *International journal of radiation biology* 1962;5:133-145.
149. Pohlit W, Heyder IR. The shape of dose-survival curves for mammalian cells and repair of potentially lethal damage analyzed by hypertonic treatment. *Radiation research* 1981;87:613-634.
150. Joiner MC. The linear-quadratic approach to fractionation. In: Steel GG, editor Basic clinical radiology. London: Edward Arnold; 1993.
151. Dale RG. The application of the linear-quadratic dose-effect equation to fractionated and protracted radiotherapy. *British journal of radiology* 1985;58:515-528.
152. Bentzen SM, Ritter MA. The alpha/beta ratio for prostate cancer: What is it, really? *Radiotherapy and oncology* 2005;76:1-3.
153. 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* 1988;27:105-116.

154. Joiner MC, Denekamp J. The effect of small radiation doses on mouse skin. *British Journal of Cancer* 1986;7:63-66.

155. Marples B, Collis SJ. Low-dose hyper-radiosensitivity: Past, present, and future. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2008;70:1310-1318.

156. Thomas C, Charrier J, Massart C, Cherel M, Fertil B, Barbet J, Foray N. Low-dose hyper-radiosensitivity of progressive and regressive cells isolated from a rat colon tumour: Impact of DNA repair. *International journal of radiation biology* 2008;84:533-548.

157. 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;49:379-389.

158. Marples B, Wouters BG, Collis SJ, Chalmers AJ, Joiner MC. Low-dose hyper-radiosensitivity: A consequence of ineffective cell cycle arrest of radiation-damaged g2-phase cells. *Radiation research* 2004;161:247-255.

159. Vaganay-Juery S, Muller C, Marangoni E, Abdulkarim B, Deutsch E, Lambin P, Calsou P, Eschwege F, Salles B, Joiner M, Bourhis J. Decreased DNA-pk activity in human cancer cells exhibiting hypersensitivity to low-dose irradiation. *British journal of cancer* 2000;83:514-518.

160. Short SC, Woodcock M, Marples B, Joiner MC. Effects of cell cycle phase on low-dose hyper-radiosensitivity. *International journal of radiation biology* 2003;79:99-105.

161. Perez AF, Devic C, Foray N. Les faibles doses de radiations : Vers une nouvelle lecture de l'évaluation du risque ? *Bulletin du cancer* 2015;102:527-538.

162. Devic C, Bodgi L, Granzotto A, Ferlazzo ML, Sonzogni L, Bourguignon M, Foray N. Le phénomène d'hypersensibilité aux faibles doses : Une énigme de la radiobiologie enfin résolue ? *Revue de médecine nucléaire* 2016; in press.

163. Despeignes V. Observation concernant un cas de cancer de l'estomac traité par les rayons roentgen. *Lyon Medical* 1896:428-430.

164. Bouchacourt L. Sur la différence de sensibilité aux rayons de roentgen de la peau des différents sujets, et, sur le même sujet des différents régions du corps. *Comptes-Rendus des Sessions de l'Association Française pour l'Avancement des Sciences* 1911;40ème Congrès - Dijon:942-947.

165. Foray N. [leon bouchacourt (1865-1949): How an obstetrician pointed out individual radiosensitivity]. *Cancer radiotherapie* 2015;19:752-761.
166. Foray N, Colin C, Bourguignon M. 100 years of individual radiosensitivity: How we have forgotten the evidence. *Radiology* 2012;264:627-631.
167. Foray N, Colin C, Bourguignon M. Radiosensibilité : L'évidence d'un facteur individuel. *Médecine Sciences* 2013;29:397-403.
168. Curie P, Becquerel H. Action physiologique des rayons du radium. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 1901;82:1289.
169. Bergonié J, Tribondeau L. Interprétation de quelques résultats de la radiothérapie et essai de fixation d'une technique rationnelle. *Comptes-rendus de l'Académie des Sciences* 1906;143:983-984.
170. Vogin G, Foray N. The law of bergonie and tribondeau: A nice formula for a first approximation. *International journal of radiation biology* 2012.
171. Wetterer J. La radiothérapie des néoplasmes sous-cutanées. *Archives d'Electricité Médicale* 1910;18:229-240.
172. Foray N. [victor despeignes (1866-1937): How a hygienist became the first radiation oncologist]. *Cancer radiotherapie* 2013;17:244-254.
173. Schiff E, Freund L. Contribution à l'étude de la radiothérapie. *Annales d'Electrobiologie* 1898;1:468-482.
174. Sciences AFplAd. Association française pour l'avancement des sciences. Compte-rendu de la 35ème session - electricité médicale. In: Masson, editor. Lyon. 1906. pp. 243-248.
175. Bergonié J, Tribondeau L. Actions des rayons x sur le testicule du rat blanc. *Comptes-Rendus de la Société de Biologie (Paris)* 1904;57:400-402.
176. Hoerni B. Jean bergonié. Paris: Editions Glyphe; 2007.
177. Arcelin F. Existe-t-il en radiothérapie des idiosyncrasies spontanées ou acquises. *Archives d'Electricité Médicale* 1911;10:37-61.
178. Plowman PN, Bridges BA, Arlett CF, Hinney A, Kingston JE. An instance of clinical radiation morbidity and cellular radiosensitivity, not associated with ataxia-telangiectasia. *British journal of radiology* 1990;63:624-628.
179. Pritchard J, Sandland M, Breatnach F, Pincott J, Cox R, P H. The effect of radiation therapy for hodgkin's disease in a child with ataxia telangiectasia : A clinical, biological and pathologic study. *Cancer* 1982;50:877-886.

180. Morgan JL, Holcomb TM, Morrissey RW. Radiation reaction in ataxia telangiectasia. *American journal of diseases of children* 1968;116:557-558.
181. Pietrucha BM, Heropolitanska-Pliszka E, Wakulinska A, Skopczynska H, Gatti RA, Bernatowska E. Ataxia-telangiectasia with hyper-igm and wilms tumor: Fatal reaction to irradiation. *Journal of Pediatric Hematological Oncology*2010;32:e28-30.
182. Ash D. Lessons from epinal. *Clinical Oncology* 2007;19:614-615.
183. Peiffert D, Simon JM, Eschwege F. [epinal radiotherapy accident: Passed, present, future]. *Cancer radiotherapie* 2007;11:309-312.
184. 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. *International journal of cancer* 1998;79:606-613.
185. ICRP. Recommendations of the international commission on radiological protection. Icrp publication 103. *Annals of the ICRP* 2007;37:1-332.
186. ICRP. Avoidance of radiation injuries from medical interventional procedures. Publication 85. *Annals of the ICRP* 2000;30:1-72.
187. ASN, Echelle asn-sfro pour la prise en compte des événements de radioprotection affectant des patients dans le cadre d'une procédure médicale de radiothérapie. Paris. ASN, 2008.
188. 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. *Seminars in Radiation Oncology* 2003;13:176-181.
189. National Institute of Health, Common terminology criteria for adverse events (ctcae) version 4.0. May 28, 2009 (v4.03: June 14, 2010)2010.
190. Stone HB, Coleman CN, Anscher MS, McBride WH. Effects of radiation on normal tissue: Consequences and mechanisms. *Lancet Oncology* 2003;4:529-536.
191. ICRP. Icrp statement on tissue reactions and early and late effects of radiation in normal tissues and organs-threshold doses for tissue reactions in a radiation protection context. Publication 118. *Annals of the ICRP* 2012;41:1-322.
192. Dorr W, Hendry JH. Consequential late effects in normal tissues. *Radiotherapy and oncology* 2001;61:223-231.

193. 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.

194. Syllaba L, Hennen K. Contribution à l'indépendance de l'athétose double idiopathique et congénitale. Atteinte familiale, syndrôme dystrophique, signe du réseau vasculaire conjonctival, intégrité psychique. *Revue Neurologique (Paris)* 1926;5:541-562.

195. Louis-Bar M. Sur un syndrôme progressif comprenant des telangiectasies capillaires cutanées et conjonctivales symétriques, à disposition naevoïde et des troubles cérébelleux. *Confines neurologiques* 1941;4:32-43.

196. Jorgensen TJ, Shiloh Y. The atm gene and the radiobiology of ataxia-telangiectasia. *International journal of radiation biology* 1996;69:527-537.

197. McKinnon PJ. Ataxia-telangiectasia: An inherited disorder of ionizing-radiation sensitivity in man. Progress in the elucidation of the underlying biochemical defect. *Human genetics* 1987;75:197-208.

198. Bundey S. Clinical and genetic features of ataxia-telangiectasia. *International journal of radiation biology* 1994;66:S23-29.

199. Aurias A. Ataxia-télangiectasie : Aspects cliniques épidémiologiques et génétiques. *Médecine/Sciences* 1994;10:957-961.

200. Taylor AM, Harnden DG, Arlett CF, Harcourt SA, Lehmann AR, Stevens S, Bridges BA. Ataxia telangiectasia: A human mutation with abnormal radiation sensitivity. *Nature* 1975;258:427-429.

201. Painter RB, Young BR. Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: A new explanation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1980;77:7315-7317.

202. Houldsworth J, Lavin MF. Effect of ionizing radiation on DNA synthesis in ataxia telangiectasia cells. *Nucleic acids research* 1980;8:3709-3720.

203. Swift M, Morrell D, Massey RB, Chase CL. Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia. *New England journal of medicine* 1991;325:1831-1836.

204. 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. *Nature Genetics* 2003;33:497-501.

205. Lees-Miller SP, Godbout R, Chan DW, Weinfeld M, Day RS, 3rd, Barron GM, Allalunis-Turner J. Absence of p350 subunit of DNA-activated protein kinase from a radiosensitive human cell line. *Science* 1995;267:1183-1185.

206. van der Burg M, Ijspeert H, Verkaik NS, Turul T, Wiegant WW, Morotomi-Yano K, Mari PO, Tezcan I, Chen DJ, Zdzienicka MZ, van Dongen JJ, van Gent DC. A DNA-pkcs mutation in a radiosensitive t-b- scid patient inhibits artemis activation and nonhomologous end-joining. *Journal of Clinical Investigation* 2009;119:91-98.

207. van der Burg M, van Dongen JJ, van Gent DC. DNA-pkcs deficiency in human: Long predicted, finally found. *Current opinion in allergy and clinical immunology* 2009;9:503-509.

208. Liu Y, Zhou K, Zhang H, Shugart YY, Chen L, Xu Z, Zhong Y, Liu H, Jin L, Wei Q, Huang F, Lu D, Zhou L. Polymorphisms of lig4 and xrcc4 involved in the nhej pathway interact to modify risk of glioma. *Human Mutations* 2008;29:381-389.

209. O'Driscoll M, Gennery AR, Seidel J, Concannon P, Jeggo PA. An overview of three new disorders associated with genetic instability: Lig4 syndrome, rs-scid and atr-seckel syndrome. *DNA repair* 2004;3:1227-1235.

210. O'Driscoll M, Cerosaletti KM, Girard PM, Dai Y, Stumm M, Kysela B, Hirsch B, Gennery A, Palmer SE, Seidel J, Gatti RA, Varon R, Oettinger MA, Neitzel H, Jeggo PA, Concannon P. DNA ligase iv mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency. *Molecular Cell* 2001;8:1175-1185.

211. Moshous D, Callebaut I, de Chasseval R, Corneo B, Cavazzana-Calvo M, Le Deist F, Tezcan I, Sanal O, Bertrand Y, Philippe N, Fischer A, de Villartay JP. Artemis, a novel DNA double-strand break repair/v(d)j recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell* 2001;105:177-186.

212. Goodarzi AA, Yu Y, Riballo E, Douglas P, Walker SA, Ye R, Harer C, Marchetti C, Morrice N, Jeggo PA, Lees-Miller SP. DNA-pk autophosphorylation facilitates artemis endonuclease activity. *EMBO journal* 2006;25:3880-3889.

213. Buck D, Moshous D, de Chasseval R, Ma Y, le Deist F, Cavazzana-Calvo M, Fischer A, Casanova JL, Lieber MR, de Villartay JP. Severe combined immunodeficiency and microcephaly in siblings with hypomorphic mutations in DNA ligase iv. *Eur J Immunol* 2006;36:224-235.

214. Ahnesorg P, Smith P, Jackson SP. Xlf interacts with the xrcc4-DNA ligase iv complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* 2006;124:301-313.

215. Stewart GS, Stankovic T, Byrd PJ, Wechsler T, Miller ES, Huissoon A, Drayson MT, West SC, Elledge SJ, Taylor AM. Riddle immunodeficiency syndrome is linked to defects in 53bp1-mediated DNA damage signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104:16910-16915.

216. Stewart GS, Panier S, Townsend K, Al-Hakim AK, Kolas NK, Miller ES, Nakada S, Ylanko J, Olivarius S, Mendez M, Oldreive C, Wildenhain J, Tagliaferro A, Pelletier L, Taubenheim N, Durandy A, Byrd PJ, Stankovic T, Taylor AM, Durocher D. The riddle syndrome protein mediates a ubiquitin-dependent signaling cascade at sites of DNA damage. *Cell* 2009;136:420-434.

217. FitzGerald JE, Grenon M, Lowndes NF. 53bp1: Function and mechanisms of focal recruitment. *Biochemical Society Transactions* 2009;37:897-904.

218. Weemaes CM, Hustinx TW, Scheres JM, van Munster PJ, Bakkeren JA, Taalman RD. A new chromosomal instability disorder: The nijmegen breakage syndrome. *Acta Paediatrica Scandinavia* 1981;70:557-564.

219. Taalman RD, Hustinx TW, Weemaes CM, Seemanova E, Schmidt A, Passarge E, Scheres JM. Further delineation of the nijmegen breakage syndrome. *American journal of medical genetics* 1989;32:425-431.

220. Taalman RD, Jaspers NG, Scheres JM, de Wit J, Hustinx TW. Hypersensitivity to ionizing radiation, in vitro, in a new chromosomal breakage disorder, the nijmegen breakage syndrome. *Mutation research* 1983;112:23-32.

221. Antoccia A, Ricordy R, Maraschio P, Prudente S, Tanzarella C. Chromosomal sensitivity to clastogenic agents and cell cycle perturbations in nijmegen breakage syndrome lymphoblastoid cell lines. *International journal of radiation biology* 1997;71:41-49.

222. Stewart GS, Maser RS, Stankovic T, Bressan DA, Kaplan MI, Jaspers NG, Raams A, Byrd PJ, Petrini JH, Taylor AM. The DNA double-strand break repair gene hmre11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell* 1999;99:577-587.

223. Alsbeih G, Al-Hadyan K, Al-Harbi N. Assessment of carriers' frequency of a novel mre11 mutation responsible for the rare ataxia telangiectasia-like disorder. *Genetic Tests* 2008;12:387-389.

224. Fernet M, Gribaa M, Salih MA, Seidahmed MZ, Hall J, Koenig M. Identification and functional consequences of a novel mre11 mutation affecting 10 saudi arabian

patients with the ataxia telangiectasia-like disorder. *Human molecular genetics* 2005;14:307-318.

225. Waltes R, Kalb R, Gatei M, Kijas AW, Stumm M, Sobeck A, Wieland B, Varon R, Lerenthal Y, Lavin MF, Schindler D, Dork T. Human rad50 deficiency in a nijmegen breakage syndrome-like disorder. *American journal of human genetics* 2009;84:605-616.

226. Ramirez CL, Cadinanos J, Varela I, Freije JM, Lopez-Otin C. Human progeroid syndromes, aging and cancer: New genetic and epigenetic insights into old questions. *Cellular and Molecular Life Science* 2007;64:155-170.

227. 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. *Nature Medicine* 2008;14:767-772.

228. Feunteun J. [a paradox and three egnimas about the role of brca1 in breast and ovarian cancers]. *Journal de la Société de Biolologie* 2004;198:123-126.

229. Huen MS, Sy SM, Chen J. Brca1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nature reviews in Molecular cell biology* 2010;11:138-148.

230. Scully R, Puget N. Brca1 and brca2 in hereditary breast cancer. *Biochimie* 2002;84:95-102.

231. Ramus SJ, Gayther SA. The contribution of brca1 and brca2 to ovarian cancer. *Molecular Oncology* 2009;3:138-150.

232. Garcia MJ, Fernandez V, Osorio A, Barroso A, Fernandez F, Urioste M, Benitez J. Mutational analysis of fancl, fancm and the recently identified fanci suggests that among the 13 known fanconi anemia genes, only fancd1/brca2 plays a major role in high-risk breast cancer predisposition. *Carcinogenesis* 2009;30:1898-1902.

233. Papadopoulo D, Moustacchi E. [fanconi anemia: Genes and function(s) revisited]. *Médecine Sciences (Paris)* 2005;21:730-736.

234. Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, Cox B, Waisfisz Q, De Die-Smulders C, Persky N, Grompe M, Joenje H, Pals G, Ikeda H, Fox EA, D'Andrea AD. Biallelic inactivation of brca2 in fanconi anemia. *Science* 2002;297:606-609.

235. de Vathaire F, collective ICeee, 2008. Paris FIe, 421–439. Cancer du sein: Facteurs de risques reconnus, données épidémiologiques concernant les irradiations.Paris: INSERM; 2008.

236. Petit C, Sancar A. Nucleotide excision repair: From e. Coli to man. *Biochimie* 1999;81:15-25.

237. Lambert WC, Gagna CE, Lambert MW. Xeroderma pigmentosum: Its overlap with trichothiodystrophy, cockayne syndrome and other progeroid syndromes. *Advances in Experimental and Medical Biolology* 2008;637:128-137.

238. Zhang Y, Rohde LH, Wu H. Involvement of nucleotide excision and mismatch repair mechanisms in double strand break repair. *Current in Genomics* 2009;10:250-258.

239. Bellizzi AM, Frankel WL. Colorectal cancer due to deficiency in DNA mismatch repair function: A review. *Advances in Anatomo Pathology* 2009;16:405-417.

240. Half E, Bercovich D, Rozen P. Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J Rare Dis* 2009;4:22.

241. Petit C. Usher syndrome: From genetics to pathogenesis. *Annual Review in Genomics and Human Genetics* 2001;2:271-297.

242. Foray N, Badie C, Alsbeih G, Lambin P, Geara F, Taghian AG, Deschavanne P, Gueulette J, Courdi A, Chavaudra N, Fertil B. Edmond-philippe malaise (1930-2013): A lifetime of perseverance leads to the cellular definition of intrinsic radiosensitivity. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2014;88:1215-1217.

243. Bodgi L. Thèse de doctorat : Modélisation de la réponse moléculaire et cellulaire aux radiations ionisantes : Impact du transit cyto-nucléaire de la protéine d'atm. Soutenue le 7 janvier 2015. Université de Lyon, France; Université Saint-Joseph, Beyrouth, Liban.; 2015.

244. Barnett GC, Coles CE, Elliott RM, Baynes C, Luccarini C, Conroy D, Wilkinson JS, Tyrer J, Misra V, Platte R, Gulliford SL, Sydes MR, Hall E, Bentzen SM, Dearnaley DP, Burnet NG, Pharoah PD, Dunning AM, West CM. Independent validation of genes and polymorphisms reported to be associated with radiation toxicity: A prospective analysis study. *Lancet Oncology* 2012;13:65-77.

245. Badie C, Dziwura S, Raffy C, Tsigani T, Alsbeih G, Moody J, Finnon P, Levine E, Scott D, Bouffler S. Aberrant cdkn1a transcriptional response associates with abnormal sensitivity to radiation treatment. *British journal of cancer* 2008;98:1845-1851.

246. Jeggo PA, Lobrich M. DNA double-strand breaks: Their cellular and clinical impact? *Oncogene* 2007;26:7717-7719.

247. Joubert A, Vogin G, Devic C, Granzotto A, Viau M, Maalouf M, Thomas C, Colin C, Foray N. [radiation biology: Major advances and perspectives for radiotherapy]. *Cancer radiotherapie* 2011;15:348-354.

248. Xie H, Mason MM, Wise JP, Sr. Genotoxicity of metal nanoparticles. *Review in Environnemental Health* 2011;26:251-268.

249. Gastaldo J, Viau M, Bouchot M, Joubert A, Charvet AM, Foray N. Induction and repair rate of DNA damage: A unified model for describing effects of external and internal irradiation and contamination with heavy metals. *Journal of theoretical biology* 2008;251:68-81.

250. Viau M, Gastaldo J, Z. B, Joubert A, Foray N. Cadmium inhibits non-homologous end-joining and over-activates the mre11-dependent repair pathway.*Mutation research* 2008;654:13-21.

251. Joubert A, Foray N. 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 N. Y.: Nova Science Publishers, Inc.; 2006. pp. Chapter 10.

252. Massart C, Joubert A, Granzotto A, Viau M, Seghier F, Balosso J, Foray N. Prediction of the human radiosensitivity : What is the most relevant endpoint? Gene expressions, mutations or functions? In: Hauppauge NY, editor Genotoxicity, testing and prediction. New York, USA: Nova Science Publishers, Inc.; 2009.

253. Bennett LM, Brownlee HA, Hagavik S, Wiseman RW. Sequence analysis of the rat brca1 homolog and its promoter region. *Mammalian Genome* 1999;10:19-25.

254. Cole J, Arlett CF, Green MH, Harcourt SA, Priestley A, Henderson L, Cole H, James SE, Richmond F. 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. *International journal of radiation biology* 1988;54:929-943.

255. 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: 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;59:749-765.

256. 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.

257. Bekker-Jensen S, Lukas C, Kitagawa R, Melander F, Kastan MB, Bartek J, Lukas J. Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *Journal of Cellular Biology* 2006;173:195-206.

258. Bekker-Jensen S, Mailand N. Assembly and function of DNA double-strand break repair foci in mammalian cells. *DNA repair* 2010;9:1219-1228.

259. Franchitto A, Pichierri P. Bloom's syndrome protein is required for correct relocalization of rad50/mre11/nbs1 complex after replication fork arrest. *Journal of Cellular Biology* 2002;157:19-30.

260. Franchitto A, Pichierri P. Protecting genomic integrity during DNA replication: Correlation between werner's and bloom's syndrome gene products and the mre11 complex. *Human molecular genetics* 2002;11:2447-2453.

261. Maser RS, Monsen KJ, Nelms BE, Petrini JH. Hmre11 and hrad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks. *Molecular and Cellular Biology* 1997;17:6087-6096.

262. Mirzoeva OK, Petrini JH. DNA damage-dependent nuclear dynamics of the mre11 complex. *Molecular and Cellular Biology* 2001;21:281-288.

263. Scully R, Chen J, Plug A, Xiao Y, Weaver D, Feunteun J, Ashley T, Livingston DM. Association of brca1 with rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 1997;88:265-275.

264. Scully R, Chen J, Ochs RL, Keegan K, Hoekstra M, Feunteun J, Livingston DM. Dynamic changes of brca1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell* 1997;90:425-435.

265. Stewart GS, Wang B, Bignell CR, Taylor AM, Elledge SJ. Mdc1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature* 2003;421:961-966.

266. Roy L, Gregoire E, Durand V, Buard V, Delbos M, Paillole N, Sorokine-Durm I, Gourmelon P, Voisin P. Study of the tools available in biological dosimetry to estimate the dose in cases of accidental complex overexposure to ionizing radiation: The lilo accident. *International journal of radiation biology* 2006;82:39-48.

267. Testard I, Sabatier L. Biological dosimetry for astronauts: A real challenge. *Mutation research* 1999;430:315-326.

268. Jakob B, Durante M. Radiation dose detection by imaging response in biological targets. *Radiation research* 2012;177:524-532.

269. Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G. Gamma-h2ax in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic acids research* 2008;36:5678-5694.

270. Neumaier T, Swenson J, Pham C, Polyzos A, Lo AT, Yang P, Dyball J, Asaithamby A, Chen DJ, Bissell MJ, Thalhammer S, Costes SV. Evidence for formation of DNA repair centers and dose-response nonlinearity in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012;109:443-448.

271. Costes SV, Chiolo I, Pluth JM, Barcellos-Hoff MH, Jakob B. Spatiotemporal characterization of ionizing radiation induced DNA damage foci and their relation to chromatin organization. *Mutation res*earch 2010;704:78-87.

272. Lisby M, Barlow JH, Burgess RC, Rothstein R. Choreography of the DNA damage response: Spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell* 2004;118:699-713.

273. Lisby M, Rothstein R. Choreography of recombination proteins during the DNA damage response. *DNA repair* 2009;8:1068-1076.

274. Yang DQ, Halaby MJ, Li Y, Hibma JC, Burn P. Cytoplasmic atm protein kinase: An emerging therapeutic target for diabetes, cancer and neuronal degeneration. *Drug discovery today* 2011;16:332-338.

275. Lim DS, Kirsch DG, Canman CE, Ahn JH, Ziv Y, Newman LS, Darnell RB, Shiloh Y, Kastan MB. Atm binds to beta-adaptin in cytoplasmic vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95:10146-10151.

276. Granzotto A, Benadjaoud MA, Vogin G, Devic C, Ferlazzo ML, Bodgi L, Pereira S, Sonzogni L, Forcheron F, Viau M, Etaix A, Malek K, Mengue-Bindjeme L, Escoffier C, Rouvet I, Zabot MT, Joubert A, Vincent A, Venezia ND, Bourguignon M, Canat EP, d'Hombres A, Thebaud E, Orbach D, Stoppa-Lyonnet D, Radji A, Dore E, Pointreau Y, Bourgier C, Leblond P, Defachelles AS, Lervat C, Guey S, Feuvret L, Gilsoul F, Berger C, Moncharmont C, de Laroche G, Moreau-Claeys MV, Chavaudra N, Combemale P, Biston MC, Malet C, Martel-Lafay I, Laude C, Hau-Desbat NH,

Zioueche A, Tanguy R, Sunyach MP, Racadot S, Pommier P, Claude L, Baleydier F, Fleury B, de Crevoisier R, Simon JM, Verrelle P, Peiffert D, Belkacemi Y, Bourhis J, Lartigau E, Carrie C, De Vathaire F, Eschwege F, Puisieux A, Lagrange JL, Balosso J, Foray N. Influence of nucleoshuttling of the atm protein in the healthy tissues response to radiation therapy: Toward a molecular classification of human radiosensitivity. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2016;94:450-460.

277. Viau M, Perez AF, Bodgi L, Devic C, Granzotto A, Ferlazzo ML, Bourguignon M, Puisieux A, Lacornerie T, Lartigau E, Lagrange JL, Foray N. [repeated radiation dose effect and DNA repair: Importance of the individual factor and the time interval between the doses]. *Cancer radiotherapie* 2016;20:217-25

278. Bodgi L, Foray N. The nucleo-shuttling of the atm protein as a basis for a novel theory of radiation response: Resolution of the linear-quadratic model. *International journal of radiation biology* 2016;92:117-31.

279. Tsoularis A, Wallace J. Analysis of logistic growth models. *Math Biosci* 2002;179:21-55.

280. Verhulst P-F. Note sur la loi d'accroisssement de la population. *Bulletins de l'Académie Royale des Sciences et Belles Lettres de Bruxelles* 1846;XIII:1-3.

281. Verhulst P-F. Notice sur la loi que la population suit dans son accroissement. *Correspondance mathématique et physique* 1838;tome II, 3e série:113-121.

282. Guo Z, Kozlov S, Lavin MF, Person MD, Paull TT. Atm activation by oxidative stress. *Science* 2010;330:517-521.

283. Costes SV, Boissiere A, Ravani S, Romano R, Parvin B, Barcellos-Hoff MH. Imaging features that discriminate between foci induced by high- and low-let radiation in human fibroblasts. *Radiation research* 2006;165:505-515.

284. Krueger SA, Collis SJ, Joiner MC, Wilson GD, Marples B. Transition in survival from low-dose hyper-radiosensitivity to increased radioresistance is independent of activation of atm ser1981 activity. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2007;69:1262-1271.

285. Lobrich M, Jeggo PA. The two edges of the atm sword: Co-operation between repair and checkpoint functions. *Radiotherapy and oncology* 2005;76:112-118.

286. 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;11:87-96.

287. Deschavanne PJ, Fertil B. A review of human cell radiosensitivity in vitro. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 1996;34:251-266.
288. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. The dynamic cell. The molecules of life. Molecular cell biology, 4th edition. New York: W. H. Freeman and Company; 2000.
289. Iliakis G. Radiation-induced potentially lethal damage: DNA lesions susceptible to fixation. *International journal of radiation biology,*1988;53:541-584.
290. Marples B, Joiner MC. The response of chinese hamster v79 cells to low radiation doses: Evidence of enhanced sensitivity of the whole cell population. *Radiation research* 1993;133:41-51.
291. Colin C, Granzotto A, Devic C, Viau M, Maalouf M, Vogin G, Joubert A, Thomas C, Foray N. 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;8:96-106.
292. 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;89:813-822.
293. Ferlazzo ML, Foray N. Huntington disease: A disease of DNA methylation or DNA breaks? *American journal of pathology* 2016;186:1750-1753.
294. Huntington G. On chorea. *The medical and surgical reporter* 1872;26:1.
295. Zheng Z, Diamond MI. Huntington disease and the huntingtin protein. *Progress in Molecular and Biological Translational Science* 2013;107:189-214.
296. Rubinsztein DC, Leggo J, Barton DE, Ferguson-Smith MA. Site of (ccg) polymorphism in the hd gene. *Nature Genetics* 1993;5:214-215.
297. Rubinsztein DC, Barton DE, Davison BC, Ferguson-Smith MA. Analysis of the huntingtin gene reveals a trinucleotide-length polymorphism in the region of the gene that contains two ccg-rich stretches and a correlation between decreased age of onset of huntington's disease and cag repeat number. *Human molecular genetics* 1993;2:1713-1715.
298. Jonson I, Ougland R, Larsen E. DNA repair mechanisms in huntington's disease. *Molecular neurobiology* 2013;47:1093-1102.
299. Enokido Y, Tamura T, Ito H, Arumughan A, Komuro A, Shiwaku H, Sone M, Foulle R, Sawada H, Ishiguro H, Ono T, Murata M, Kanazawa I, Tomilin N, Tagawa K,

Wanker EE, Okazawa H. Mutant huntingtin impairs ku70-mediated DNA repair. *Journal of Cell Biology* 2010;189:425-443.

300. Arlett CF, Muriel WJ. Radiosensitivity in huntington's disease. *Heredity* 1979;42:276.

301. Arlett CF. Presymptomatic diagnosis of huntington's disease? *Lancet* 1980;1:540.

302. Arlett CF, Priestley A. Deficient recovery from potentially lethal damage in some gamma-irradiated human fibroblast cell strains. *British Journal of Cancer* 1984;6:227-232.

303. Moshell AN, Tarone RE, Barrett SF, Robbins JH. Radiosensitivity in huntington's disease: Implications for pathogenesis and presymptomatic diagnosis. *Lancet* 1980;1:9-11.

304. McGovern D, Webb T. Sensitivity to ionising radiation of lymphocytes from huntington's chorea patients compared to controls. *Journal of Medical Genetics* 1982;19:168-174.

305. 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.

306. Gatti RA. The inherited basis of human radiosensitivity. *Acta Oncologica* 2001;40:702-711.

307. Lopez E, Guerrero R, Nunez MI, del Moral R, Villalobos M, Martinez-Galan J, Valenzuela MT, Munoz-Gamez JA, Oliver FJ, Martin-Oliva D, Ruiz de Almodovar JM. Early and late skin reactions to radiotherapy for breast cancer and their correlation with radiation-induced DNA damage in lymphocytes. *Breast cancer research* 2005;7:R690-698.

308. Pouliliou SE, Lialiaris TS, Dimitriou T, Giatromanolaki A, Papazoglou D, Pappa A, Pistevou K, Kalamida D, Koukourakis MI. Survival fraction at 2 gy and gammah2ax expression kinetics in peripheral blood lymphocytes from cancer patients: Relationship with acute radiation-induced toxicities. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2015;92:667-674.

309. Goutham HV, Mumbrekar KD, Vadhiraja BM, Fernandes DJ, Sharan K, Kanive Parashiva G, Kapaettu S, Bola Sadashiva SR. DNA double-strand break analysis by gamma-h2ax foci: A useful method for determining the overreactors to radiation-induced acute reactions among head-and-neck cancer patients. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2012;84:e607-612.

310. Ruiz de Almodovar JM, Nunez MI, McMillan TJ, Olea N, Mort C, Villalobos M, Pedraza V, Steel GG. Initial radiation-induced DNA damage in human tumour cell lines: A correlation with intrinsic cellular radiosensitivity. *British journal of cancer* 1994;69:457-462.

311. Nunez MI, Villalobos M, Olea N, Valenzuela MT, Pedraza V, McMillan TJ, Ruiz de Almodovar JM. Radiation-induced DNA double-strand break rejoining in human tumour cells. *British journal of cancer* 1995;71:311-316.

312. Mouri K, Nacher JC, Akutsu T. A mathematical model for the detection mechanism of DNA double-strand breaks depending on autophosphorylation of atm. *PloS one* 2009;4:e5131.

313. 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.

314. Hannan MA, Sackey K, Sigut D. Cellular radiosensitivity of patients with different types of neurofibromatosis. *Cancer genetics and cytogenetics* 1993;66:120-125.

315. Jeggo PA. Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiation research* 1998;150:S80-91.

316. McKinnon PJ, Caldecott KW. DNA strand break repair and human genetic disease. *Annual Review in Genomics and Human Genetics* 2007;8:37-55.

317. Weiss JF, Landauer MR. History and development of radiation-protective agents. *International journal of radiation biology* 2009;85:539-573.

318. Slonina D, Biesaga B, Urbanski K, Kojs Z. Low-dose radiation response of primary keratinocytes and fibroblasts from patients with cervix cancer. *Radiation research* 2007;167:251-259.

319. Slonina D, Biesaga B, Urbanski K, Kojs Z. The response of primary keratinocytes and fibroblasts from cancer patients to multiple low-dose irradiations. *Radiation research* 2007;168:631-636.

320. Slonina D, Biesaga B, Urbanski K, Kojs Z. Comparison of chromosomal radiosensitivity of normal cells with and without hrs-like response and normal tissue reactions in patients with cervix cancer. *International journal of radiation biology* 2008;84:421-428.

321. Slonina D, Biesaga B, Urbanski K, Kojs Z, Waligorski M. Evidence of low-dose hyper-radiosensitivity in normal cells of cervix cancer patients? *Radiation protection dosimetry* 2006;122:282-284.

322. Bodgi L, Canet A, Granzotto A, Britel M, Puisieux A, Bourguignon M, Foray N. [the enigma of the biological interpretation of the linear-quadratic model finally resolved? A summary for non-mathematicians]. *Cancer radiotherapie* 2016;20:314-321.

323. Strangeways TSP, Oakley HEH. The immediate changes observed in tissue cells after exposure to soft x-rays while growing in vitro. *Proceedings of the Royal Society London B* 1923;95:373-381.

324. Crowther JA. Some considerations relative to the action of x-rays on tissue cells. *Proceedings of the Royal Society London* 1924;B96:207-211.

325. Holweck F. Production de rayons x monochromatiques de grande longueur d'onde. Action quantique sur les microbes. *Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences* 1929;188:197-199.

326. Lacassagne A. Action des rayons x de grande longueur d'onde sur les microbes. Etablissement de statistiques précises de la mortalité des bactéries irradiées. *Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences* 1929;188:200-202.

327. Curie M. Sur l'étude des courbes de probabilité relatives à l'action des rayons x sur les bacilles *Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences* 1929;188:202-204.

328. Brenner DJ, Herbert DE. The use of the linear-quadratic model in clinical radiation oncology can be defended on the basis of empirical evidence and theoretical argument. *Medical physics* 1997;24:1245-1248.

329. Regaud C, Blanc J. Action des rayons x sur les diverses générations de la lignée spermatique. Extrême sensibilité des spermatogonies à ces rayons. *Comptes-Rendus de la Société de Biologie* 1906;61:163-165.

ANNEXES

Matériels et méthodes

Nous avons choisi de décrire succinctement les principaux protocoles utilisés les travaux de thèse. Cependant, on trouvera tous les détails dans les articles qui figurent en fin de manuscrit.

1 Lignées, cultures cellulaires, traitement ZoPra

Les fibroblastes non transformés utilisés dans cette étude sont issus de biopsie de peau:
- de patients atteints de la MH, NF1, TSC, HGPS et proviennent de la collection américaine du Coriell Institute.
- d'un patient traité par radiothérapie, ayant présenté des réactions tissulaires sur-aigues et classé comme radiosensible de groupe II.
- de patients radiorésistants sans signe clinique particulier (lignée 155 BR et 142 BR) et proviennent de la collection européenne de la Health Protection Agency (ECACC). Ces lignées seront utilisées comme témoins radiorésistants (données historiques du laboratoire).

Les cellules ont été cultivées dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM 1640) complété par 20% de Sérum de Veau Foetal (SVF ; Gibco) et des antibiotiques (50000 UI.l -1 de pénicilline, 50 mg.ml -1 de Streptomycine ; Gibco), rincées au PBS 1X (Na2HPO4 80 mM, NaH2PO4 20 mM, NaCl 120 mM, pH 7,4) puis trypsinées avec une solution de Trypsine et d'EDTA, Gibco. Toutes les expériences ont été réalisées à confluence.

Le traitement par le ZOPRA est appliqué selon (227). Les cellules ont été incubées avec 1µM de pravastatine (Sigma-Aldrich France, France) dans de l'eau stérile pendant 24h à 37°C. Puis, 1µM de zoledronate (Novartis, France) dilué dans de l'eau stérile a été ajouté dans le milieu de culture 12h avant irradiation.

2 Irradiation

Des boites de Petri contenant les cellules ensemencées sur des lamelles de verre dans 3 ml de milieu de culture ou des flask de 175 cm3 contenant 15 ml de milieu

ont été irradiées sur un irradiateur médical (SL 15 Phillips, Centre Léon Bérard, Lyon). Les doses utilisées sont généralement de 2 Gy (1Gy = 1J/kg).

3 Immunofluorescence

Après irradiation sur lamelle dans le milieu de culture, les cellules ont été fixées pendant 10 minutes avec 100µL de paraformaldéhyde 4% (PFA), rincées avec du PBS 1X puis perméabilisées avec 100µL d'une solution de Triton dans PBS pendant 3 minutes. Après rinçage au PBS 1X 30 µL d'anticorps primaires (au 1/100) ont été ajoutés sur les cellules puis incubés pendant 45 minutes, à 37°C sous atmosphère humide. Les cellules ont été rincées au PBS 1X et 30µL d'anticorps secondaire (au 1/100) ont été appliqués sur les cellules pendant 20 minutes, à 37°C sous atmosphère humide. Une fois rincées, les lamelles sont montées sur lame de verre avec Vectashield® et DAPI H1500 (Abcys) et vernies.
Les lames sont lues grâce à un microscope équipé pour la fluorescence BX51, Olympus.

4 Extraits cellulaires

Afin de stopper la réparation rapidement et de contrôler mieux le temps, les cellules à confluence ont été placées dans du milieu de culture à 4°C avant irradiation, puis dans du milieu à 37°C après et utilisés pour réaliser des extraits cellulaires à 10 minutes, 1 heure, 4 heures et 24 heures post-irradiation. Les cellules sont ensuite collectées avec un rubber (BD Falcon) dans du PBS 1X froid et centrifugées. Les culots sont ressuspendus 2 fois dans du PBS froid et congelés à -80°C.

5 Extraits protéiques

5.1 Extraits totaux

Les culots cellulaires obtenues en 4 sont repris dans 300µL de tampon de lyse (50mM Tris pH8, 150mM NaCl, 2mM EDTA pH8, 10% glycérol, 0,2% NP40) enrichis avec des inhibiteurs de protéases, incubés 20 min à 4°C et centrifugés. Le surnageant constitue l'extrait protéique total.

5.2 Extraits cytoplasmiques et nucléaires

Les culots cellulaires obtenues en 4 sont repris dans 5 volumes de tampon A (10mM Hepes pH 5,9, 1,5mM MgCl2, 10mM KCl, 2mM EDTA pH8, 0,5mM DTT, 0,2% NP40) enrichis avec des inhibiteurs de protéases et incubés 15 min sur glace et centrifugés .Le surnageant constitue la **fraction cytoplasmique** des protéines.
Le culot est repris avec 5 volumes de tampon de lavage (tampon A sans NP40) et centrifugé. Le surnageant et éliminé et le culot est repris dans 2 volumes de tampon B (20mM Hepes pH 5,9, 1,5mM MgCl2, 450mM KCl, 2mM EDTA pH8, 2mM EGTA, 0,5mM DTT, 25% glycérol, inhibiteur de protéase), placé 1h à 4°C et centrifugé. Le surnageant constitue la **fraction nucléaire** des protéines.

6 Immunoprécipitation, SDS-PAGE et Western-blot

Les extraits protéiques obtenus en 5 sont dosés par la méthode de Bradford. Les extraits cellulaires sont dénaturés par du tampon de Laemmli et par incubation à 95°C pendant 5min. Les immunoprécipitation sont effectués avec des billes de protéines A-Sepharose (Millipore) sur 30µg d'extraits cellulaires. Il est ensuite appliqué un protocole standard de séparation par éléctrophorèse sur gel de d'acrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), puis le gel est electrotransféré sur une membrane de nitrocellulose.
La membrane est saturée pendant 1h à température ambiante dans du TBS-T (Tris25mM, pH7,6, 137mM NaCl, 27mM KCl, Tween X20 0,1%) contenant 5% de lait en poudre puis incubée successivement par les solution d'anticorps primaires et secondaires à température ambiante pendant 1h. La révélation de la membrane s'effectue par l'ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham).

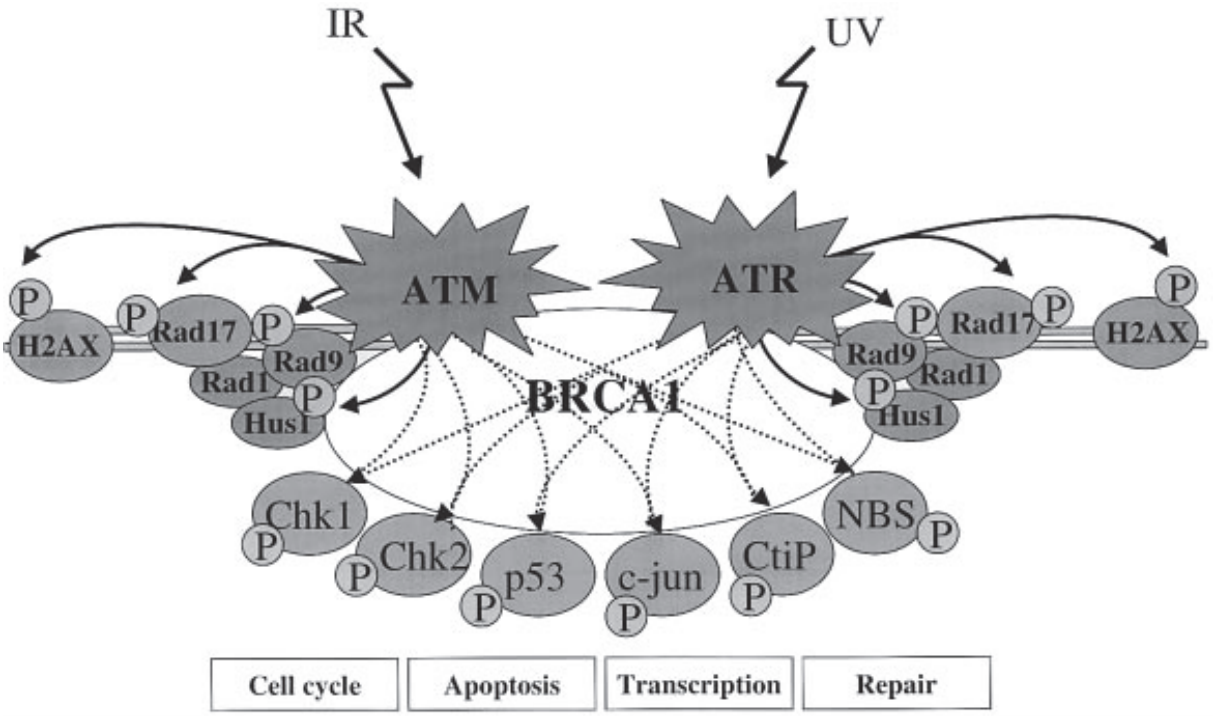


Schéma récapitulant les substrats connus d'ATM, Foray et al. 2003 (60)

ARTICLE B

International Journal of Radiation Oncology biology • physics

www.redjournal.org

Biology Contribution

Influence of Nucleoshuttling of the ATM Protein in the Healthy Tissues Response to Radiation Therapy: Toward a Molecular Classification of Human Radiosensitivity

The COPERNIC project investigators, Adeline Granzotto, BSc,[*] Mohamed Amine Benadjaoud, PhD,[†] Guillaume Vogin, MD, PhD,[*,‡] Clément Devic, MSc,[*] Mélanie L. Ferlazzo, MSc,[*] Larry Bodgi, PhD,[*,§] Sandrine Pereira, PhD,[*] Laurène Sonzogni, BSc,[*] Fabien Forcheron, PhD,[‖] Muriel Viau, PhD,[*] Aurélie Etaix, PharmaD,[*] Karim Malek, MD, PhD,[*] Laurence Mengue-Bindjeme, MD, MSc,[*] Clémence Escoffier, MSc,[¶] Isabelle Rouvet, PharmD, PhD,[¶] Marie-Thérèse Zabot, PhD,[¶] Aurélie Joubert, PhD,[#] Anne Vincent, PhD,[*] Nicole Dalla Venezia, PhD,[*] Michel Bourguignon, MD, PhD,[#] Edme-Philippe Canat, MD,[**] Anne d'Hombres, MD,[††] Estelle Thébaud, MD,[‡‡] Daniel Orbach, MD,[§§] Dominique Stoppa-Lyonnet, MD, PhD,[§§] Abderraouf Radji, MD,[‖‖] Eric Doré, MD,[¶¶] Yoann Pointreau, MD,[##] Céline Bourgier, MD, PhD,[***] Pierre Leblond, MD, PhD,[†††] Anne-Sophie Defachelles, MD,[†††] Cyril Lervat, MD,[†††] Stéphanie Guey, MD,[‡‡‡] Loic Feuvret, MD,[‡‡‡] Françoise Gilsoul, MD,[§§§] Claire Berger, MD,[‖‖‖] Coralie Moncharmont, MD,[‖‖‖] Guy de Laroche, MD,[‖‖‖] Marie-Virginie Moreau-Claeys, MD,[‡] Nicole Chavaudra, PhD,[¶¶¶] Patrick Combemale, MD,[###] Marie-Claude Biston, PhD,[###] Claude Malet, PhD,[###] Isabelle Martel-Lafay, MD,[###] Cécile Laude, MD,[###] Ngoc-Hanh Hau-Desbat, MD,[###,****] Amira Zioueche, MD,[###] Ronan Tanguy, MD,[###] Marie-Pierre Sunyach, MD,[###] Séverine Racadot, MD,[###] Pascal Pommier, MD, PhD,[###] Line Claude, MD,[###] Frédéric Baleydier, MD, PhD,[††††] Bertrand Fleury, MD,[‡‡‡‡]

Reprint requests 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. Tel: +33 4 26 55 67 94; E-mail: Nicolas.foray@inserm.fr

A. Granzotto, G. Vogin, and M. A. Benadjaoud contributed equally to this work.

Conflict of interest: none.

Supplementary material for this article can be found at www.redjournal.org.

Acknowledgment—The authors thank the patients for their contribution and Madame Beaufrère and the staff of the Cellular Biotechnology Center (Lyon) for their assistance. The authors are grateful to the Association Pour la Recherche sur l'Ataxie-Telangiectasie, the Plan Cancer/AVIESAN, the Centre National d'Etudes Spatiales, and the Commissariat Général à l'Investissement (INDIRA project).

Int J Radiation Oncol Biol Phys, Vol. 94, No. 3, pp. 450–460, 2016
0360-3016/$ - see front matter © 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.ijrobp.2015.11.013

Renaud de Crevoisier, MD, PhD,[§§§§] Jean-Marc Simon, MD, PhD,[‡‡‡] Pierre Verrelle, MD, PhD,[§§,‖‖‖‖] Didier Peiffert, MD, PhD,[‡] Yazid Belkacemi, MD, PhD,[¶¶¶¶] Jean Bourhis, MD, PhD,[####] Eric Lartigau, MD, PhD,[†††] Christian Carrie, MD,[###] Florent De Vathaire, PhD,[‡] François Eschwege, MD, PhD,[¶¶¶] Alain Puisieux, PharmD, PhD,[*] Jean-Léon Lagrange, MD, PhD,[¶¶¶¶] Jacques Balosso, MD, PhD,[*****] and Nicolas Foray, PhD[*]

INSERM, UMR1052, Cancer Research Centre of Lyon, Lyon, †INSERM UMRS 1018, Institut Gustave-Roussy, Villejuif, ‡Institut de Cancérologie de Lorraine, Vandoeuvre-les-Nancy, France; §Université Saint-Joseph, Beirut, Lebanon; ‖Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Brétigny-sur-Orge, ¶Centre de Biotechnologie Cellulaire et Biothèque, Groupement Hospitalier Est, Hospices Civils de Lyon, Bron, #Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Fontenay-aux-Roses, **Clinique Jean-Mermoz, Lyon, ††Groupement Hospitalier Sud, Hospices Civils de Lyon, Pierre-Bénite, ‡‡Centre Hospitalier Universitaire, Nantes, §§Institut Curie, Paris, ‖‖Centre Joliot-Curie, Rouen, ¶¶Centre Hospitalier Universitaire, Clermont-Ferrand, ##Centre Hospitalier Régional Universitaire Bretonneau, Tours, ***Institut du Val d'Aurelle, Montpellier, †††Centre Oscar-Lambret, Lille, ‡‡‡Hôpital La Pitié-Salpétrière, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Paris, France; §§§Hôpital Saint Joseph, Charleroi, Belgique; ‖‖‖‖Centre Hospitalier Universitaire, Saint-Etienne, ¶¶¶Institut Gustave-Roussy, Villejuif, ###Centre Léon-Bérard, Lyon, ****Centre Hospitalier Métropôle-Savoie, Chambéry, ††††Institut d'Hématologie et d'Oncologie Pédiatrique, Hospices Civils de Lyon, Lyon, ‡‡‡‡Centre Marie Curie, Valence, §§§§Centre Eugène-Marquis, Rennes, ‖‖‖‖‖Centre Jean-Perrin, Clermont-Ferrand, ¶¶¶¶Hôpital Henri-Mondor, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Créteil, France; ####Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Switzerland; and *****Centre Hospitalier Universitaire, Grenoble, France

Received Jul 27, 2015, and in revised form Oct 24, 2015. Accepted for publication Nov 5, 2015.

Summary

Whereas post—radiation therapy overreactions (OR) represent a clinical and societal issue, there is still no consensus to predict clinical radiosensitivity. Since 2003, hundreds of skin biopsy specimens have been collected from patients treated by radiation therapy against different tumor localizations and showing a wide range of OR. We found a significant correlation between the maximal number of phosphorylated forms of ATM protein with each OR severity grade, independently of tumor localization, and the early or late nature of reactions.

Purpose: Whereas post—radiation therapy overreactions (OR) represent a clinical and societal issue, there is still no consensual radiobiological endpoint to predict clinical radiosensitivity. Since 2003, skin biopsy specimens have been collected from patients treated by radiation therapy against different tumor localizations and showing a wide range of OR. Here, we aimed to establish quantitative links between radiobiological factors and OR severity grades that would be relevant to radioresistant and genetic hyperradiosensitive cases.

Methods and Materials: Immunofluorescence experiments were performed on a collection of skin fibroblasts from 12 radioresistant, 5 hyperradiosensitive, and 100 OR patients irradiated at 2 Gy. The numbers of micronuclei, γH2AX, and pATM foci that reflect different steps of DNA double-strand breaks (DSB) recognition and repair were assessed from 10 minutes to 24 hours after irradiation and plotted against the severity grades established by the Common Terminology Criteria for Adverse Events and the Radiation Therapy Oncology Group.

Results: OR patients did not necessarily show a gross DSB repair defect but a systematic delay in the nucleoshuttling of the ATM protein required for complete DSB recognition. Among the radiobiological factors, the maximal number of pATM foci provided the best discrimination among OR patients and a significant correlation with each OR severity grade, independently of tumor localization and of the early or late nature of reactions.

Conclusions: Our results are consistent with a general classification of human radiosensitivity based on 3 groups: radioresistance (group I); moderate radiosensitivity caused by delay of nucleoshuttling of ATM, which includes OR patients (group II); and hyperradiosensitivity caused by a gross DSB repair defect, which includes fatal cases (group III).
© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Among patients treated with radiation therapy (RT), 5% to 15% exhibit tissue overreactions (OR) which limit the application of the scheduled treatment, increase morbidity and represent a medical and societal issue (1-3). Although considerable efforts are provided to define common clinical criteria for quantifying OR severity (4-6), the biological causes of OR remain controversial. Inasmuch as OR may be similar to the reactions expected after a dose excess, OR were long been suggested to be due to dosimetry errors. However, the recent RT accident in Epinal (France) demonstrated that the same dose excess may cause a large spectrum of OR severities, reflecting individual radiosensitivity (7, 8).

Individual radiosensitivity is a continuous and dose-dependent phenomenon: predictive endpoints should reflect these properties through quantitative correlations between radiobiological and clinical factors. While quantitative correlations between radiosensitivity and genomics are rare, a large body of evidence suggests that unrepairable DNA double-strand breaks (DSB) are the molecular bases of radiosensitivity:

1. Micronuclei and unrepaired chromosome breaks, both consequences of unrepaired DSB, are correlated with radiosensitivity (9).

2. Clonogenic cell survival and unrepaired DSB repair are correlated (10, 11).

3. The syndromes caused by mutations of DSB repair proteins are systematically associated with radiosensitivity (12, 13).

4. ATM kinase, whose mutations cause ataxia telangiectasia, the most radiosensitive syndrome, is upstream of the major DSB repair pathways (14-17).

Despite these arguments and because of the variety of techniques and of experimental protocols (doses, repair times, cell types) and the complexity of DSB repair pathways, there is still no consensus for the DSB repair criteria to reliably predict radiosensitivity.

Since 2003 our group has accumulated hundreds of skin fibroblasts eliciting a large range of radiosensitivity. With cells deriving from well-characterized radiosensitive genetic syndromes, a first classification of radiosensitivity in 3 groups was proposed (10): group I, complete DSB repair, radioresistance, and low cancer risk; group II, incomplete DSB repair, moderate radiosensitivity, and high cancer risk; and group III, gross DSB repair defect, hyperradiosensitivity, and high cancer risk.

More recently, we have provided experimental and theoretical clues that the radiation-induced nucleoshuttling of ATM strengthens this classification by analyzing the radiation response of 45 fibroblasts deriving from OR patients (18) and that it is at the basis of a novel resolution of the linear quadratic model that has described the dose-response since the 1970s (19). Here, from 100 skin fibroblast cell lines deriving from OR patients, links between ATM-dependent radiobiological factors and clinical OR severity grades were investigated to propose a classification of human radiosensitivity that would be common to any radiosensitive cases, whether well characterized genetically or observed during or after radiation therapy.

Methods and Materials

Collection of skin fibroblasts

This study was conducted with 117 skin-untransformed fibroblasts including 12 radioresistant, 4 $ATM^{-/-}$, and 1 $LIG4^{-/-}$ gifted cell lines (10) and 100 fibroblasts derived from OR patients belonging to the COPERNIC collection. This collection was approved by the regional ethical committee. Cell lines were declared under the numbers DC2008-585 and DC2011-1437 to the Ministry of Research. The database was protected under the reference as IDDN.FR.001.510017.000.D.P.2014.000.10300. All the anonymous patients were informed and gave signed consent according to the ethics recommendations. Since 2003, skin biopsy specimens have been collected in more than 30 French or Belgian anticancer centers and hospitals by about 60 clinicians. Sampling was performed in unirradiated areas after local anesthesia and the use of standardized dermatologic punch. Clinical data on tumor characteristics and therapy regimens were extracted from the medical records. The OR severity was graded by 2 independent clinicians according to the Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) version 4.03 (20) and the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) (21) scales. Only OR patients with consensual clinical grading were included in this study. Both early and late reactions were considered (see Supplementary Data; available online at www.redjournal.org). It is noteworthy that all the OR patients of the collection showed grade 1 to 4 tissue reactions. Hyperradiosensitive patients succumbed after radiation therapy (grade 5). Radioresistant cells were provided either from apparently healthy individuals with no cancer history or from cancer patients with no reactions (grade 0). After sampling, cell biopsy specimens were cultured according to standard procedures. Details about the collection are in Supplementary Data (available online at www.redjournal.org).

Irradiation

The skin fibroblasts were irradiated (2 Gy) in the plateau phase of growth to mimic healthy tissues and to avoid any artifacts resulting from the cell cycle. Irradiation was performed with γ-radiation provided by medical accelerators and has been described elsewhere (22).

Immunofluorescence

Protocols for immunofluorescence with antibodies against pATM and γH2AX proteins and with DAPI counterstaining for scoring micronuclei have been described previously (10, 22) (see Supplementary Data; available online at www.redjournal.org).

Statistical analysis

Statistics and data analysis were performed with MathLab 7 (Mathwork, Natick, MA) and Kaleidagraph 4.5 (Synergy Software, Reading, PA). The foci kinetics were fitted by using the formula of Bodgi et al (18). The correlation between radiobiological factors and severity grade were examined by linear, exponential, or polynomial regression analysis. Analysis of variance (ANOVA) was used to compare the means of the maximal number of ATM foci (pATMmax) chosen in the different OR severity grade categories by comparing the ratio of the between-variance with the within-category variance. Given to the natural ordering of the OR severity scale values, a cumulative logit model was used (23). For example, for the ordinal response variable $CTCAE_{Grade}$, which can fall in 6 categories, we focused on modeling how the probabilities $P\ (CTCAE_{Grade=j})$, $j = 0,1,\ldots,5$ depend on the explanatory variable pATMmax. Thus, the logits incorporating the ordinal information were modeled as:

$$\frac{P(\mathrm{CTCAE}_{\mathrm{Grade}} \le j)}{P(\mathrm{CTCAE}_{\mathrm{Grade}} > j)} = \alpha_j + \beta \times \mathrm{pATMmax} \quad \text{for } j = 0, 1, \ldots, 5 \qquad (1)$$

where α_j are the cutpoints between grade categories and β the regression coefficient. This common slope can be interpreted as the increase in log-odds of falling into category $CTCAE_{Grade \le j}$ versus $CTCAE_{Grade > j}$, resulting from a 1-unit increase in the pATMmax covariate. By calculating exp(β), we obtained an estimate of the cumulative odds ratio. Finally, the probabilities $P\ (CTCAE_{Grade=j})$, can be computed as:

$$P(\mathrm{CTCAE}_{\mathrm{Grade}=0}) = P(\mathrm{CTCAE}_{\mathrm{Grade}<0})$$
$$P\left(\mathrm{CTCAE}_{\mathrm{Grade}=j}\right) = P\left(\mathrm{CTCAE}_{\mathrm{Grade}\le j}\right) - P\left(\mathrm{CTCAE}_{\mathrm{Grade}\le j-1}\right),\ j = 1,\ \ldots 5 \qquad (2)$$

$$\text{where } P\left(\mathrm{CTCAE}_{\mathrm{Grade}\le j}\right) = \frac{\exp\left(\alpha_j + \beta \times \mathrm{pATMmax}\right)}{1 + \exp\left(\alpha_j + \beta \times \mathrm{pATMmax}\right)} \qquad (3)$$

Results

Nuclear ATM forms phosphorylate H2AX variant histones to give γH2AX foci. The γH2AX and autophosphorylated ATM (pATM) foci are considered the earliest recognition steps of DSB managed by nonhomologous end-joining (NHEJ), the major DSB repair pathway in humans (24-27). Micronuclei are the consequences of unrepaired DSB that propagate along the cell cycle leading to chromosomal fragments (28) or by lagging of whole chromosomes. Here, micronuclei, γH2AX and pATM foci were chosen as radiobiological endpoints. The CTCAE and RTOG scales were used as clinical endpoints.

Spontaneous micronuclei and DSB do not predict radiosensitivity

By analysis of the numbers of micronuclei, γH2AX, and pATM foci in unirradiated cells, 2 subpopulations appeared: the radioresistant and the OR + hyperradiosensitive patients ($P<.01$). No significant correlation with CTCAE (Fig. 1) or RTOG grades (data not shown) was observed, supporting that data on unirradiated cells cannot predict radiosensitivity.

Radiation-induced micronuclei discriminate 3 subpopulations of patients

The number of micronuclei remaining 24 hours after irradiation discriminated 3 subpopulations: radioresistant, OR ($P<.05$), and hyperradiosensitive patients ($P=.001$) according to CTCAE grades. Interestingly, these subpopulations corresponded to the 3 groups of radiosensitivity evoked above. The same number of micronuclei could not discriminate the OR cases ($P>.5$), whether with the CTCAE or the RTOG scale (Fig. 2). These results suggest that radiation-induced micronuclei can distinguish groups I, II, and III but not interindividual OR patient responses.

Residual γH2AX foci discriminate 4 subpopulations of patients

When the number of γH2AX foci was plotted against repair time after 2 Gy, a great variety of DSB repair kinetics appeared (Fig. 3A). After irradiation, the DSB recognition phase (during which the number of foci increases) precedes the DSB repair phase (during which the number of foci decreases) (18). In agreement with previous studies (10, 18), the γH2AX foci kinetics assessed discriminated 5 types of curve shapes:

In the cells showing more than 70 γH2AX foci 10 minutes after 2 Gy, the DSB recognition is compatible with the commonly-accepted DSB induction rate of about 40 DSB per Gy and can be considered complete. The

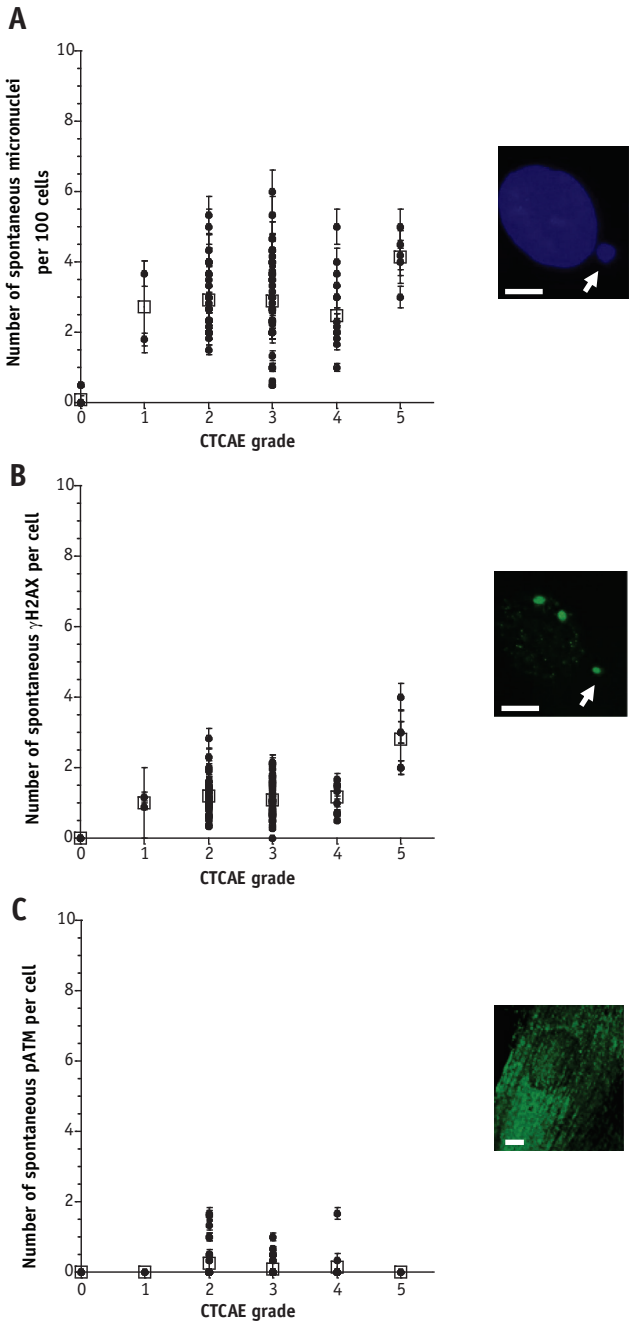


Fig. 1. Number of micronuclei (A), γH2AX (B), and pATM (C) foci as a function of Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) grades. Each plot represents the mean ± standard error of the mean of 3 independent replicates. Open squares represent the mean ± standard deviation for each grade. Representative immunofluorescence photos are provided. The DAPI picture is the counterstained image of the γH2AX one. Arrow indicates a micronucleus. White bars represent 5 μm.

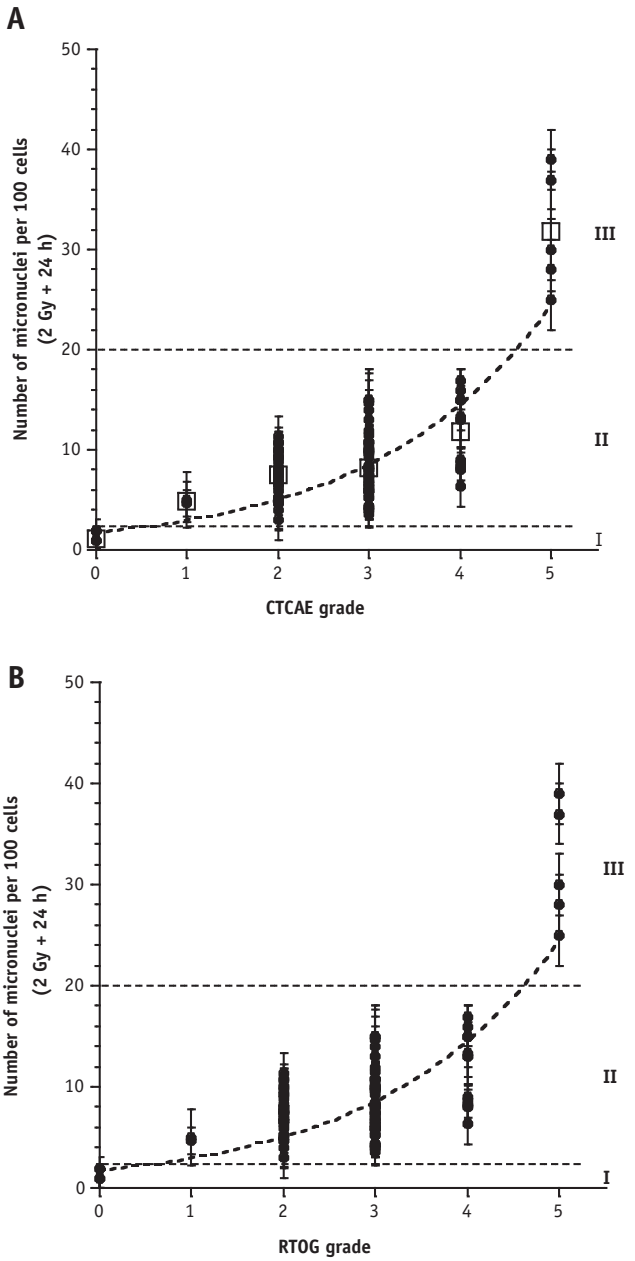


Fig. 2. Number of residual micronuclei as a function of Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) (A) and Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) (B) grades. Each plot represents the mean ± standard error of the mean of 3 independent replicates. Open squares represent the mean ± standard deviation for each grade category. Dotted line data fitting represents an exponential law ($y = 1.75\ e^{0.526x}$, $r = 0.82$). However, this formula cannot discriminate the overreaction cases significantly. The groups of radiosensitivity are indicated in roman characters.

number of γH2AX foci decreased up to 24 hour and 3 situations were identified (Fig. 3A).

1. The number of residual γH2AX foci was less than 3 (complete DSB recognition and repair, group I radioresistance);
2. The number of γH2AX foci was greater than 3 but less than 8 (complete DSB recognition and incomplete DSB repair, group II radiosensitivity; eg, OR patient cells).

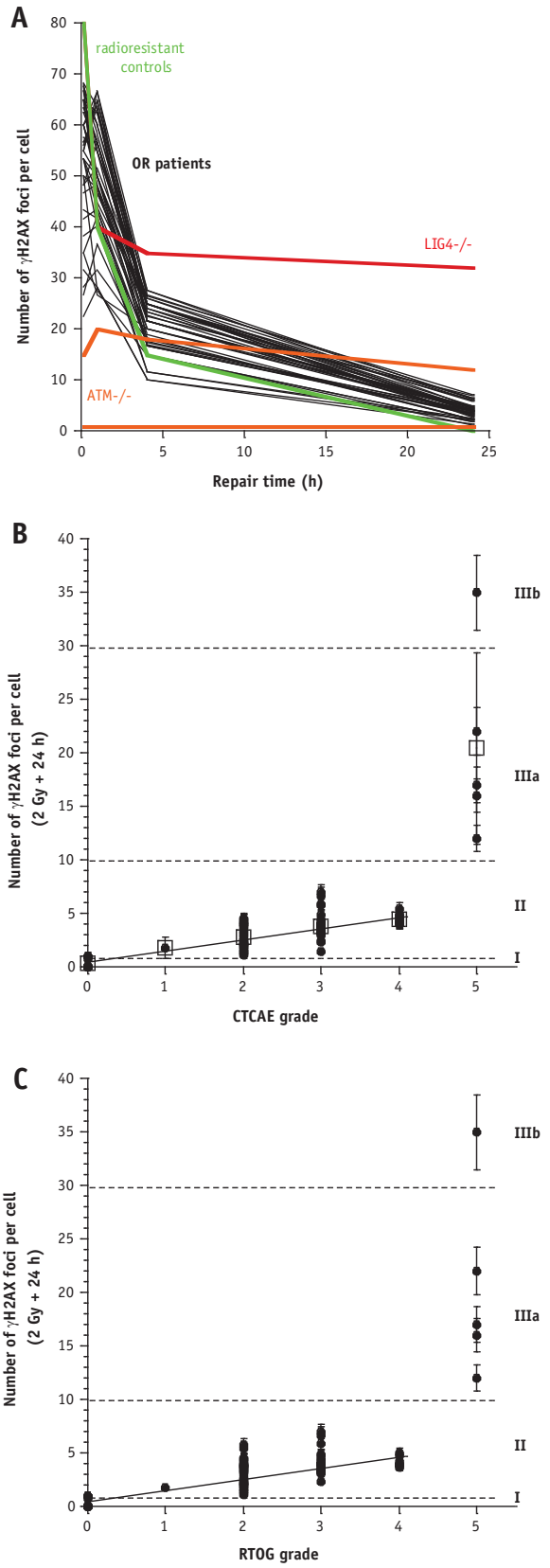


Fig. 3. Number of residual γH2AX foci as a function of Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) or Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) grades. (A) Representative examples of γH2AX foci time kinetics obtained from cells of the collection. For convenience, error bars and plot markers are omitted. (B, C) The numbers of γH2AX foci remaining 24 hours after 2 Gy are plotted against the CTCAE or RTOG grades, respectively. Each plot represents the mean ± standard error of the mean of 3 independent replicates. Open squares represent the mean ± standard deviation for each grade category. Dotted line data fitting represents an exponential law ($y = 0.498\ e^{0.692x}$, $r=0.9$). However, this formula cannot discriminate the overreaction cases significantly. The groups of radiosensitivity are indicated in roman characters.

3. The number of residual γH2AX foci was greater than 8 (normal DSB recognition but DSB repair defect, group IIIb hyperradiosensitivity; eg, LIG4$^{-/-}$ cells) (10).

In the cells showing fewer than 70 γH2AX foci 10 minutes after 2 Gy, 2 situations were identified:

4. The number of γH2AX foci decreased up to 24 hours after irradiation and reached values greater than 3 but less than 8 (delayed DSB recognition and incomplete DSB repair, group II radiosensitivity; eg, OR patient cells).
5. The number of γH2AX foci 24 hours after irradiation was either less than 3 or greater than 8 (gross DSB recognition and repair defects, group IIIa hyperradiosensitivity; eg, ATM$^{-/-}$ cells) (10).

Inside the OR patient subpopulation, no significant correlation was found between residual γH2AX foci and CTCAE (Fig. 3B) and RTOG (Fig. 3C) grades. These data suggest that residual γH2AX foci cannot discriminate the radiosensitivity cases of OR patients but can predict group I, II, IIIa, and IIIb radiosensitivity as defined in the Introduction.

ATM nucleoshuttling in the cells from OR patients

The statement that about 40 DSB are induced per Gy per human diploid cell, independently of radiosensitivity status, has been documented abundantly (25, 29-31). Here, nearly all OR patients showed less initial radiation-induced γH2AX foci than expected (Fig. 4A). These findings cannot be explained by physical considerations, shorter nucleus size, or different spontaneous ATM expressions (data not shown). Similar observations have been made in cells from well-characterized group II syndromes (18, 22). Inasmuch as H2AX phosphorylation requires ATM kinase activity and the great majority of pATM forms are cytoplasmic (Fig. 4B), we previously proposed a model in which DSB recognition is ensured by a radiation-induced nucleoshuttling of ATM kinase. Immunoblots with

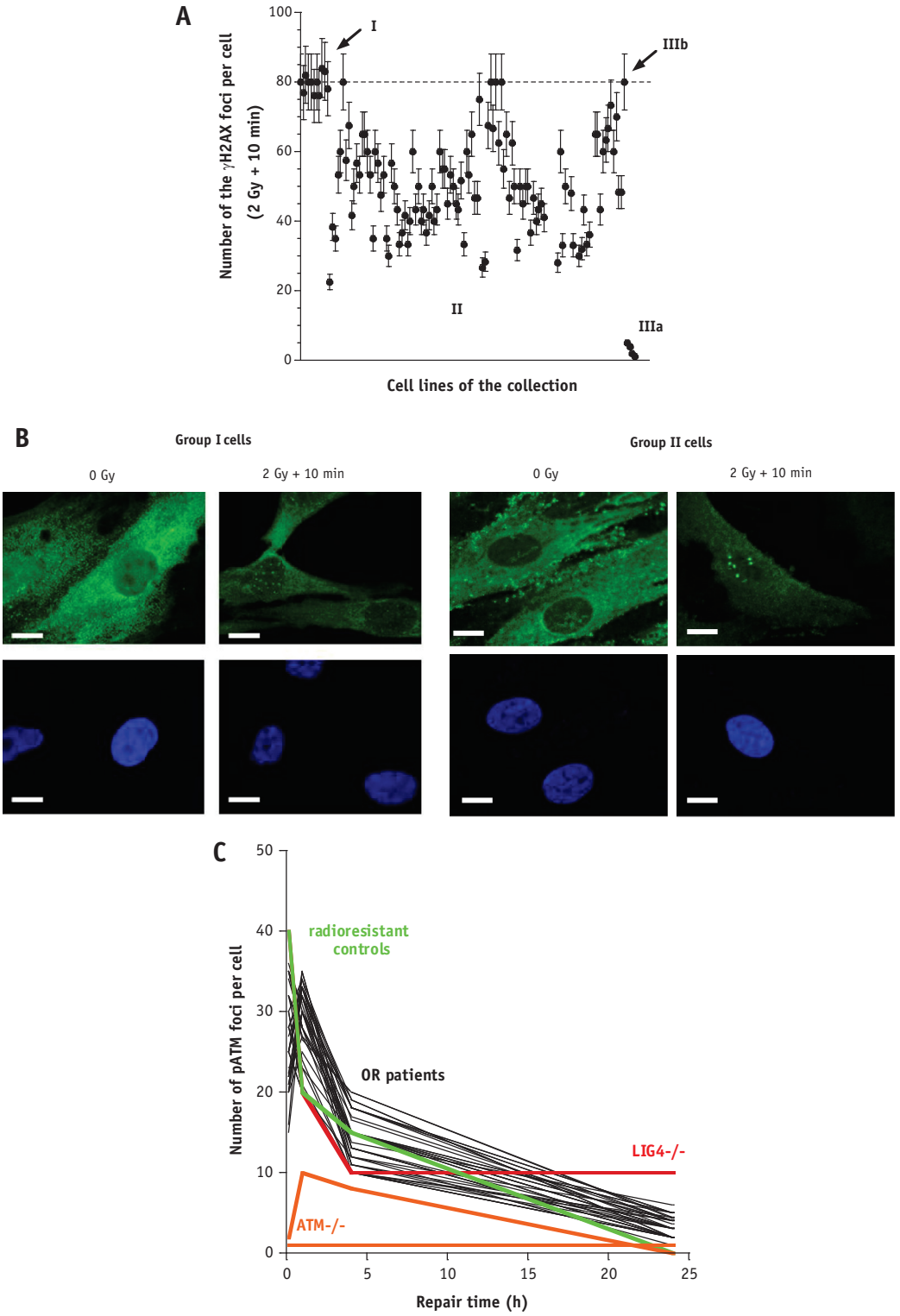
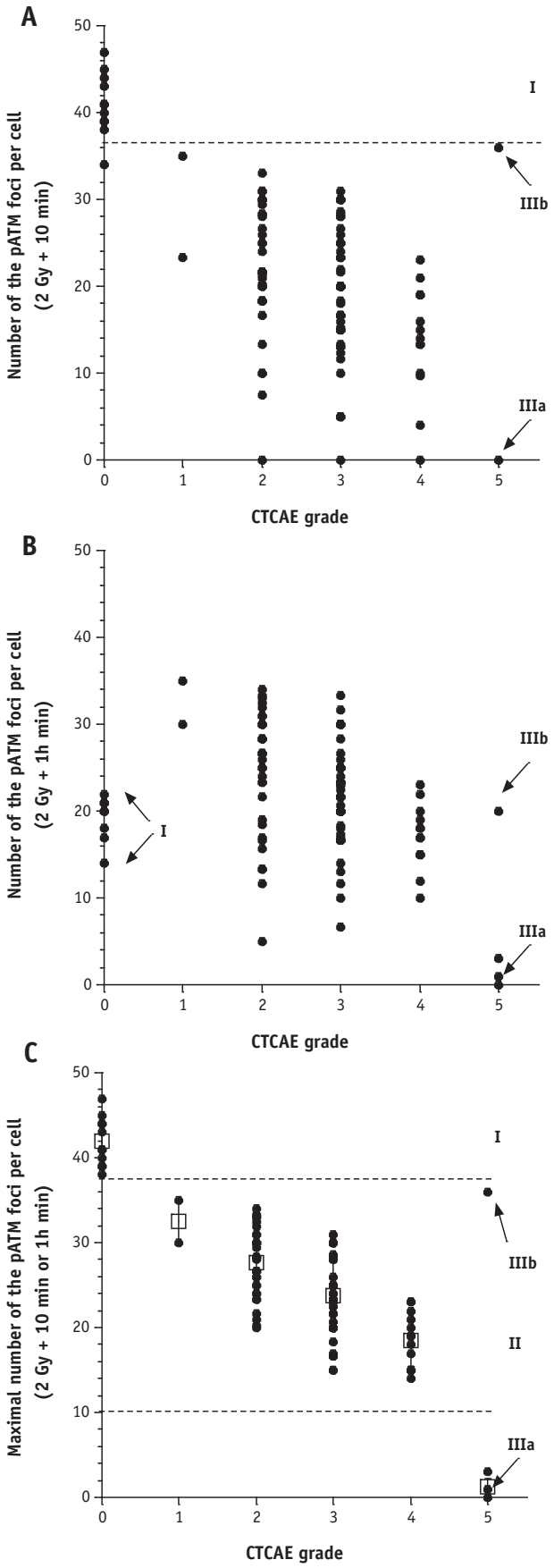


Fig. 4. The pATM foci data suggest a nucleoshuttling of ATM protein. (A) The number of γH2AX foci scored 10 minutes after 2 Gy are provided for all the cell lines of the collection: dotted line indicates the normal double-strand breaks (DSB) incidence of 40 DSB per Gy per cell. Each plot represents the mean ± standard error of the mean of 3 independent replicates. The group of radiosensitivity is indicated in roman characters. (B) Representative immunofluorescence against pATM antibodies (green) and DAPI counterstaining (blue) was applied to unirradiated (0 Gy) and irradiated (2 Gy + 10 min) to group I and group II fibroblasts. White bar represents 5 μm. (C) Representative examples of pATM foci time kinetics obtained from cells of the collection. For convenience, error bars and plot markers are omitted. *Abbreviation:* OR = overreaction.



cytoplasmic and nuclear extracts (19) and immunofluorescence data (Fig. 4C) confirmed that the nucleoshuttling of ATM is systematically delayed in OR patient cells.

Early pATM foci predict the radiosensitivity of OR patients

The numbers of pATM foci after 10 minutes and 1 hour after irradiation were not correlated with CTCAE (Figs. 5A and 5B) or RTOG grades (see Supplementary Data; available online at www.redjournal.org). Conversely, the maximal number of ATM foci chosen between 10-minute or 1-hour data, pATMmax, discriminated all the grades through a linear formula ($r>0.8$) and was the best predictor of this study (Fig. 5C) (Fig. E1; available online at www.redjournal.org). Particularly, a statistically significant difference was found between pATMmax and the CTCAE grades (ANOVA $P<.0001$). The partition of total pATMmax led to more than 77% of the variability attributable to intercategory variability. Table E1 (available online at www.redjournal.org) represents the results of the cumulative logit model regression. The estimated coefficient for the pATMmax was 0.38, with an associated odds ratio equal to exp(0.38) = 1.46 (95% confidence interval 1.34-1.60). This means that the odds ratio of the event "$CTCAE_{Grade \leq j}$" is increased by 46% for each additional pATMmax unit. The resulting concordance and discordance coefficients were 85.5% and 14.5%, respectively (see Supplementary Data; available online at www.redjournal.org).

The donors had different types of tumors. To examine the impact of tumor localization on the correlation pATMmax versus CTCAE grades, data from the most frequent tumor types (eg, tumors of breast; prostate; ear, nose, and throat; nervous systems) were analyzed separately. Whatever the situation, the cases were homogeneously distributed among the grades. Furthermore, pATMmax showed comparable correlation with CTCAE grades for each tumor localization to that obtained with the whole data (Fig. E2; available online at www.redjournal.org). Similarly, when early or late OR data were considered, the same relationship between pATMmax and CTCAE grades was found (Fig. E3; available online at

Fig. 5. Number of residual pATM foci as a function of severity of Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) grade. The pATM foci were scored after either 2 Gy + 10 minutes (A) or 2 Gy + 1 hour (B). (C) Maximal number of pATM between the 2 corresponding values shown in A and B. For A, B, and C, each plot represents the mean ± standard error of the mean of 3 independent replicates, and open squares represent the mean ± standard deviation for each grade category. The group of radiosensitivity is indicated in roman characters.

www.redjournal.org). Altogether, these analyses demonstrate that pATMmax can predict OR severity independently of tumor localization and the early or late nature of OR. Similar conclusions were reached with RTOG grades (see Supplementary Data; available online at www.redjournal.org).

Both γH2AX and pATM foci are required for a better description of radiosensitivity

The residual γH2AX foci reflect DSB repair deficiency, and the number of early pATM foci reflects DSB recognition. Given that radiosensitivity can be caused by impairments of

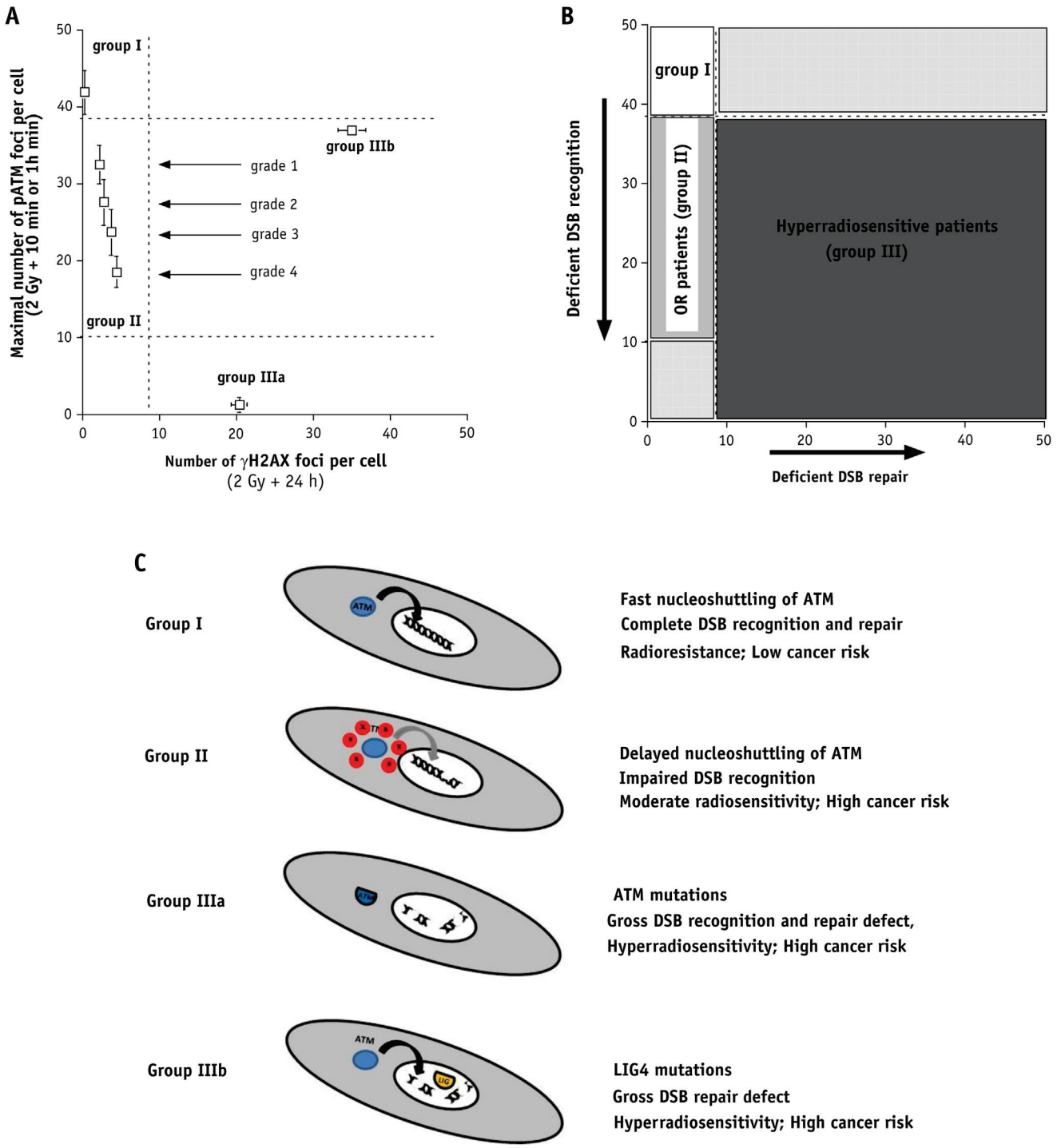


Fig. 6. Radiosensitivity is determined by both double-strand breaks (DSB) recognition and repair data. (A) The average values of the number of γH2AX and pATM foci shown in Figure 3B and Figure 5C, respectively, are plotted together. (B) The information shown in A is reproduced in squared confidence areas. (C) Summary of the different cases of human radiosensitivity.

either process or both processes, these 2 factors are required to predict the whole range of human radiosensitivity. When the corresponding numbers of γH2AX and pATM foci were plotted on the same graph, some natural limits appeared. For example, there is no radiosensitive cell line that can show both normal DSB repair and impaired DSB recognition (Fig. 6).

Discussion

An approach independent of tumor localization and type of OR

The goal of this study was to establish quantitative links between in vitro and in vivo radiosensitivity by considering ATM-dependent radiobiological factors and CTCAE or RTOG grades as molecular and clinical endpoints respectively. It must be stressed that we deliberately chose to predict OR radiosensitivity level rather than OR occurrence time.

The correlation obtained here is independent of tumor localization, and pATMmax covers all the cases of tissue radiosensitivity as far as it is upstream from the diversity factors of the radiation response because (*1*) the CTCAE and RTOG scales quantify the severity of OR whatever the tumor localization (20, 21), (*2*) the mutations of different genes may lead to the same level of radiosensitivity (32), and (*3*) the ATM-dependent NHEJ pathway is the major DSB repair pathway in humans, whatever the tissues (33).

Another important feature of our approach is that each grade is predicted separately and obeys a general formula, whereas nearly all published studies share clinical responses in 2 arbitrary grade categories (0 + 1+2 vs 3 + 4) (34-36). For the first time, this approach also integrates grade 5 (fatal OR), which permits integration of the well-characterized radiosensitive genetic syndromes with the radiosensitive cases observed in radiation therapy (Fig. 5).

The great majority of the experiments published in the field are performed with blood cells (34-36). However, OR generally concern conjunctive tissues (ie, fibroblasts). Fibroblast cell lines can be cultured and amplified routinely and do not elicit autofluorescence and apoptosis, which can bias immunofluorescence observations. Another advantage of ex vivo fibroblasts is that their amplification dilutes any presence of chemotherapy drugs and therefore their effects (see Supplementary Data; available online at www.redjournal.org). Some preliminary data suggest that the nucleoshuttling of ATM can also be indirectly measured on lymphocytes (data not shown). Further experiments are, however, required to evaluate the reliability of our approach with blood cells.

Nucleoshuttling of ATM at the molecular basis of the radiosensitivity

To date, the paradigm to explain radiosensitivity is a DSB repair defect (31, 37). Nevertheless, many syndromes such as progeria, Bruton's disease, neurofibromatosis, and Huntington's disease show significant radiosensitivity, although they are caused by mutations in cytoplasmic proteins that are not involved in DSB repair (22, 38-41). To provide a coherent explanation for all cases of human radiosensitivity, we proposed a model based on the radiation-induced nucleoshuttling of ATM (18, 22). Although it is commonly believed that ATM is mostly predominant into the nucleus, experiments are generally performed with total extracts, nonirradiated cells, or both (unpublished data). Our last report on Huntington's disease showed that mutated huntingtin sequestrates ATM in cytoplasm, which delays the nucleoshuttling of ATM, limits DSB recognition and repair, and increases radiosensitivity (22). Our more recent findings suggest that the radiation-induced flux of ATM monomers that enter the nucleus is much higher than the quantity of ATM proteins present in the nucleus before irradiation. Besides, the nucleoshuttling of ATM is at the basis of the resolution of the linear quadratic model (unpublished data). The significant link between pATMmax and CTCAE grades is therefore based on a solid mechanistic model supported by a coherent mathematical description of the dose response.

Toward an objective scale of human radiosensitivity

One of the major conclusions of this study is that the radiosensitivity of OR patients should not be considered hyperradiosensitivity as encountered in ATM-mutated patients but rather moderate radiosensitivity like that observed in cells derived from genetic syndromes such as Bloom's syndrome, Fanconi's anemia, neurofibromatosis, and Huntington's disease (10, 38). This statement encourages the definition of a general classification of radiosensitivity based on objective and quantifiable criteria (10, 38, 42). OR patients do not necessarily have a significant DSB repair defect but have a DSB recognition impairment caused by a delay in ATM nucleoshuttling. Hence, the causes of radiosensitivity linked to OR may be mutations in some cytoplasmic ATM protein substrates, whereas hyperradiosensitivity is caused by gross DSB repair defects. Further investigations are therefore required to identify all these cytoplasmic ATM substrates to better predict clinical radiosensitivity.

References

1. Turesson I, Nyman J, Holmberg E, et al. Prognostic factors for acute and late skin reactions in radiotherapy patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996;36:1065-1075.
2. Gatti RA. The inherited basis of human radiosensitivity. *Acta Oncol* 2001;40:702-711.
3. ICRP. Radiation protection in medicine. Publication 105. *Ann ICRP* 2007;37:1-63.
4. Trotti A, Bentzen SM. The need for adverse effects reporting standards in oncology clinical trials. *J Clin Oncol* 2004;22:19-22.

5. Trotti A, Colevas AD, Setser A, et al. CTCAE v3.0: Development of a comprehensive grading system for the adverse effects of cancer treatment. *Semin Radiat Oncol* 2003;13:176-181.
6. Cox JD, Stetz J, Pajak TF. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;31:1341-1346.
7. Peiffert D, Simon JM, Eschwege F. [Epinal radiotherapy accident: Past, present, future]. *Cancer Radiother* 2007;11:309-312.
8. Ash D. Lessons from epinal. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2007;19:614-615.
9. Cornforth MN, Bedford JS. A quantitative comparison of potentially lethal damage repair and the rejoining of interphase chromosome breaks in low passage normal human fibroblasts. *Radiat Res* 1987;111:385-405.
10. Joubert A, Gamo K, Bencokova Z, 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.
11. 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.
12. Jeggo PA. Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiat Res* 1998;150:S80-S91.
13. McKinnon PJ, Caldecott KW. DNA strand break repair and human genetic disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2007;8:37-55.
14. Foray N, Marot D, Gabriel A, et al. A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *EMBO J* 2003;22:2860-2871.
15. Lobrich M, Jeggo PA. The two edges of the ATM sword: Co-operation between repair and checkpoint functions. *Radiother Oncol* 2005;76:112-118.
16. Morgan JL, Holcomb TM, Morrissey RW. Radiation reaction in ataxia telangiectasia. *Am J Dis Child* 1968;116:557-558.
17. Pietrucha BM, Heropolitanska-Pliszka E, Wakulinska A, et al. Ataxia-telangiectasia with hyper-IGM and Wilms tumor: Fatal reaction to irradiation. *J Pediatr Hematol Oncol* 2010;32:e28-e30.
18. Bodgi L, Granzotto A, Devic C, et al. A single formula to describe radiation-induced protein relocalization: Towards a mathematical definition of individual radiosensitivity. *J Theor Biol* 2013;333:135-145.
19. Bodgi L, Foray N. The nucleo-shuttling of the ATM protein as a basis for a novel theory of radiation response: resolution of the linear-quadratic model. *Int J Radiat Biol*, in press.
20. US Department of Health. Common terminology criteria for adverse events (CTCAE) version 4.0. May 28, 2009 (v4.03: June 14, 2010). 2010. evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE_4.03_2010-14_QuickReference_5×7.pdf. Accessed January 8, 2016.
21. Available at: http://www.rtog.org/. Accessed January 8, 2016.
22. Ferlazzo ML, Sonzogni L, Granzotto A, et al. Mutations of the Huntington's disease protein impact on the ATM-dependent signaling and repair pathways of the radiation-induced DNA double-strand breaks: Corrective effect of statins and bisphosphonates. *Mol Neurobiol* 2014;49:1200-1211.
23. McCullagh P. Regression models for ordinal data. *J R Stat Soc Series B* 1980;42:109-142.
24. Burma S, Chen BP, Murphy M, et al. ATM phosphorylates histone h2ax in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 2001;276:42462-42467.
25. 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;100:5057-5062.
26. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, et al. DNA double-stranded breaks induce histone h2ax phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 1998;273:5858-5868.
27. Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 2003;421:499-506.
28. Grote SJ, Joshi GP, Revell SH, et al. 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.
29. Foray N, Priestley A, Alsbeih G, et al. Hypersensitivity of ataxia telangiectasia fibroblasts to ionizing radiation is associated with a repair deficiency of DNA double-strand breaks. *Int J Radiat Biol* 1997;72:271-283.
30. 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.
31. Iliakis G. The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. *Bioessays* 1991;13:641-648.
32. Jeggo PA, Lobrich M. DNA double-strand breaks: Their cellular and clinical impact? *Oncogene* 2007;26:7717-7719.
33. Pastwa E, Blasiak J. Non-homologous DNA end joining. *Acta Biochim Pol* 2003;50:891-908.
34. Lopez E, Guerrero R, Nunez MI, 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:R690-R698.
35. Pouliliou SE, Lialiaris TS, Dimitriou T, et al. Survival fraction at 2 Gy and gammah2ax expression kinetics in peripheral blood lymphocytes from cancer patients: Relationship with acute radiation-induced toxicities. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2015;92:667-674.
36. Goutham HV, Mumbrekar KD, Vadhiraja BM, et al. DNA double-strand break analysis by gamma-h2ax foci: A useful method for determining the overreactors to radiation-induced acute reactions among head-and-neck cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012;84:e607-e612.
37. Woodbine L, Gennery AR, Jeggo PA. The clinical impact of deficiency in DNA non-homologous end-joining. *DNA Repair* 2014;16C:84-96.
38. Deschavanne PJ, Fertil B. A review of human cell radiosensitivity in vitro. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996;34:251-266.
39. Hannan MA, Sackey K, Sigut D. Cellular radiosensitivity of patients with different types of neurofibromatosis. *Cancer Genet Cytogenet* 1993;66:120-125.
40. Varela I, Pereira S, Ugalde AP, et al. Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging. *Nat Med* 2008;14:767-772.
41. Huo YK, Wang Z, Hong JH, et al. Radiosensitivity of ataxia-telangiectasia, x-linked agammaglobulinemia, and related syndromes using a modified colony survival assay. *Cancer Res* 1994;54:2544-2547.
42. Foray N, Colin C, Bourguignon M. 100 years of individual radiosensitivity: How we have forgotten the evidence. *Radiology* 2012;264:627-631.

ARTICLE I

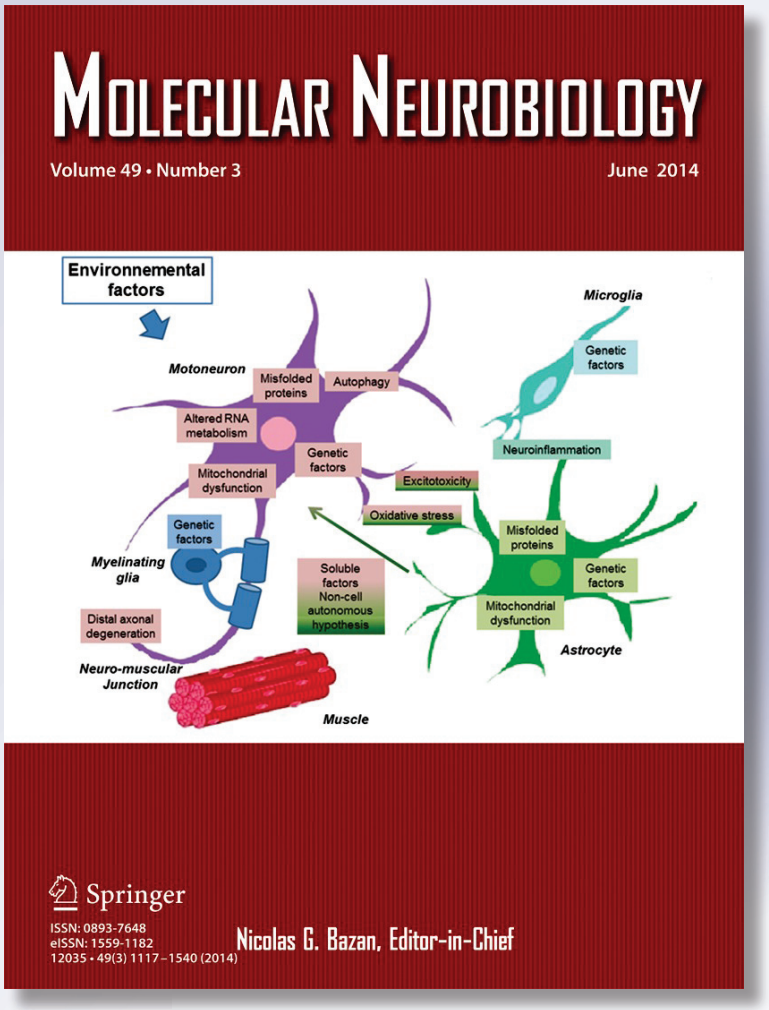
Mutations of the Huntington's Disease Protein Impact on the ATM-Dependent Signaling and Repair Pathways of the Radiation-Induced DNA Double-Strand Breaks: Corrective Effect of Statins and Bisphosphonates

Mélanie L. Ferlazzo, Laurène Sonzogni, Adeline Granzotto, Larry Bodgi, Océane Lartin, et al.

Molecular Neurobiology

ISSN 0893-7648
Volume 49
Number 3

Mol Neurobiol (2014) 49:1200-1211
DOI 10.1007/s12035-013-8591-7



Springer

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science +Business Media New York. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Author's personal copy

Mol Neurobiol (2014) 49:1200–1211
DOI 10.1007/s12035-013-8591-7

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

Mélanie L. Ferlazzo · Laurène Sonzogni · Adeline Granzotto · Larry Bodgi · Océane Lartin · Clément Devic · Guillaume Vogin · Sandrine Pereira · Nicolas Foray

Received: 9 August 2013 / Accepted: 6 November 2013 / Published online: 26 November 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract Huntington's disease (HD) is a neurodegenerative syndrome caused by mutations of the IT15 gene encoding for the huntingtin protein. Some research groups have previously shown that HD is associated with cellular radiosensitivity in quiescent cells. However, there is still no mechanistic model explaining such specific clinical feature. Here, we examined the ATM-dependent signaling and repair pathways of the DNA double-strand breaks (DSB), the key damage induced by ionizing radiation, in human HD skin fibroblasts. Early after irradiation, quiescent HD fibroblasts showed an abnormally low rate of recognized DSB managed by non-homologous end-joining reflected by a low yield of nuclear foci formed by phosphorylated H2AX histones and by 53BP1 protein. Furthermore, HD cells elicited a significant but moderate yield of unrepaired DSB 24 h after irradiation. Irradiated HD cells also presented a delayed nucleo-shuttling of phosphorylated forms of the ATM kinase, potentially due to a specific binding of ATM to mutated huntingtin in the cytoplasm. Our results suggest that HD belongs to the group of syndromes associated with a low but significant defect of DSB signaling and repair defect associated with radiosensitivity. A combination of biphosphonates and statins complements these impairments by facilitating the nucleo-shuttling of ATM, increasing the yield of recognized and repaired DSB.

Keywords Huntington's disease · Huntingtin · DSB repair · ATM · H2AX · MRE11 · Ionizing radiations

This paper is dedicated to the memory of Edmond-Philippe Malaise, pioneer of the notion of individual radiosensitivity.

M. L. Ferlazzo · L. Sonzogni · A. Granzotto · L. Bodgi · O. Lartin · C. Devic · G. Vogin · S. Pereira · N. Foray (✉)
INSERM UMR 1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Groupe de Radiobiologie–Bât Cheney A–1er etage, 28 Rue Laennec, 69008 Lyon, France
e-mail: nicolas.foray@inserm.fr

L. Bodgi
Faculté des Sciences, Université Saint-Joseph, 1107-2050 Beirut, Lebanon

G. Vogin
Centre Alexis Vautrin, 6 Avenue de Bourgogne, 54519 Vandœuvre-lès-Nancy, France

Introduction

Huntington's disease (HD), also called Huntington's chorea,[1] is an autosomal-dominant neurodegenerative disorder that was firstly identified by George Huntington in 1872 [1]. Clinical manifestations of HD generally appear after the age of 30 and lead to personality changes, movement disorders, severe motor and cognitive impairments, and death [2]. The prevalence of HD is about 5–10 cases per 100,000 individuals in European, North American, and Australian populations. HD prevalence is lower in the rest of the world [3].

HD is caused by mutations of the huntingtin (HTT or IT15) gene that lead to CAG trinucleotide repeats and generate polyglutamine (polyQ) chain expansion in the HTT sequence. Research about HD syndrome has generally focused on neurological symptoms and brain pathology, particularly on the degeneration of the basal ganglia and cerebral cortex. However, it is noteworthy that huntingtin, whether wild type or mutant, is expressed ubiquitously [4]. The HTT gene is situated on chromosome 4p16.3 and encodes for a 3,142-amino acid protein of 350 kDa. The HTT gene was identified in 1993

[1] The name chorea was historically given by Paracelsius to any disease associated with disordered movements.

Author's personal copy

[5, 6]. When the CAG repeats reach 41, HD is considered as fully penetrant. Between 36 and 41, the penetrance is incomplete and nil for less than 35 repeats [7]. PolyQ expansion may cause degradation of HTT and was shown to increase oxidative stress. In a recent review published in this journal, the requirement of a normal huntingtin in the base excision repair synthesis and the mismatch repair pathways that manage base damage and DNA adducts was evoked [8]. However, the exact role of huntingtin in these pathways and also in the DNA repair and signaling pathways concerning other DNA damage types like DNA breaks is still unknown (e.g., [9].)

In the 1980s, different research groups showed that cells provided from HD patients are sensitive to ionizing radiation by using clonogenic survival as an endpoint [10–14]. It is noteworthy that most of these studies were performed on quiescent cells (Table 1). In 1996, a survey of human radiosensitivity classified HD as one of the 10 most radiosensitive genetic syndromes among other diseases that were caused by impairment of proteins involved in DNA repair, suggesting, on the one hand, a strong link between DNA repair dysfunctions and radiosensitivity and, on the other hand, a potential involvement of the HTT protein in the repair and signaling of DNA damage induced by ionizing radiation and whose impairments cause radiosensitivity [15].

To date, our understanding of the repair of radiation-induced DNA damage has considerably progressed. This is notably the case of DNA double-strand breaks (DSB) that, if unrepaired, can result in cell lethality or, if misrepaired, can cause potential cancer onset [16, 17]. It has notably been shown that radiation-induced DSB can be determined from the number of nuclear foci formed by the phosphorylation of the variant histone H2AX (γ-H2AX) that is easily quantifiable using immunofluorescence [18]. In 2008, our data from 40 untransformed quiescent human fibroblasts representing eight different pathologies and one of the largest spectra of human radiosensitivity investigated highlighted the interplay between the non-homologous end-joining (NHEJ) DSB repair process and an MRE11-dependent, recombination-like repair pathways, both dependent on the ATM kinase activity [17]. More recently, we provided evidence that ionizing radiation may induce a nucleo-shuttling of the ATM kinase that conditions the level of radiosensitivity of quiescent fibroblasts: a first classification of intrinsic radiosensitivity was proposed on biostatistical and experimental molecular bases [19].

In this paper, in order to elucidate the molecular causes of the radiosensitivity of HD cells in the G_0/G_1 phase, we examined the radiation-induced relocalization of the major ATM phosphorylation substrates implied in DNA damage recognition and repair in untransformed HD fibroblast cell lines. The deliberate choice of the human skin fibroblastic model was motivated by the existence of our DSB repair database composed of various fibroblasts that reflect one of the largest spectra of radiosensitivity in the G_0/G_1 phase [17].

Materials and Methods

Cell Lines

Fibroblast cell lines were deliberately chosen for their genomic stability and in order to avoid any confounding effect due to immortalization. Cells were routinely cultured as monolayers with Dulbecco's modified Eagle's minimum medium (Gibco-Invitrogen-France, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 20 % fetal bovine serum, penicillin, and streptomycin. All the experiments were performed with cells in the plateau phase of growth (90–99 % in G_0/G_1) to overcome any cell cycle effects [20]. It is noteworthy that there was no significant difference in the distribution of cell cycle phases between HD and control fibroblasts and up to 24 h after irradiation (data not shown). The major radiobiological features of the untransformed radioresistant control (1BR3, 155BR, and 161BR) and the *ATM*-mutated AT5BI and the LIG4-mutated 180BR cell lines were published elsewhere [17, 20]. All the other untransformed human cell lines were purchased either from Coriell Cell Repositories (Camden, NJ) or were characterized in a previous publication [17]. The HD GM21757 and GM21756 fibroblasts were provided from

Table 1 Major publications on the cellular radiosensitivity of human HD cells

Reference	Models	Endpoint	Comment
[12]	Primary fibroblasts	Clonogenic assay	4 cell lines; more sensitive than controls
[10]	Primary fibroblasts	Clonogenic assay	nd
[13]	Lymphoblastoid cells transformed with EBV	Cell viability with the trypan blue exclusion method	4 cell lines; more sensitive than controls
[14]	Lymphocytes/whole blood	Cell viability with the trypan blue exclusion method/viability ratio	Blood samples from 22 HD patients
[40]	Primary fibroblasts	Clonogenic assay	9 cell lines; no sensitivity
[11]	Primary fibroblasts	Clonogenic assay	3 cell lines; slightly or no more sensitive than controls
[41]	Primary fibroblasts	Clonogenic assay	1 cell line; one sensitive and one normal
This paper	Primary fibroblasts	Clonogenic assay	2 cell lines; more sensitive than controls

Author's personal copy

patients with symptomatic Huntington's disease, and clinical details are provided in the Coriell Cell Repositories web site: GM21756—female, expanded CAG repeat HD alleles reported as 70; GM21757—male, expanded CAG repeat HD alleles reported as 66. With regard to the Western blot data, the SV40-transformed counterpart of 1BR3, 1BR3Neo, was also used and its radiobiological characteristics described elsewhere [21].

Irradiations

All the irradiations were performed on a 6-MeV γ-ray clinical irradiator (SL 15 Phillips) at the Anti-cancer Centre Léon-Bérard (Lyon, France) at a dose of 2 Gy, with a dose rate of 6 Gy min^{-1} to avoid any impact of DSB repair during irradiation.

ZOPRA Treatment

ZoPra treatment was applied as previously published [22]. Briefly, cells were incubated with 1 μM pravastatine (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) in phosphate-buffered saline (PBS) for 24 h at 37 °C. Thereafter, 1 μM zoledronate (Sigma-Aldrich, France) in PBS was added into the culture medium and the cells incubated for 12 h at 37 °C. The culture medium was renewed immediately before irradiation.

Cell Survival

Intrinsic radiosensitivity was quantified by calculating the surviving fraction at 2 Gy (SF2) from a standard clonogenic assay by plating cells in the plateau phase of growth 24 h after irradiation (delayed plating), as previously described [20]. Survival data are fitted to the linear-quadratic model that links survival S as a function of dose

$$S = \exp\left(-\alpha D - \beta D^2\right) \quad (1)$$

where α and β are adjustable parameters.

Immunofluorescence

The immunofluorescence protocol was described elsewhere [21]. Briefly, cells were fixed in paraformaldehyde for 10 min at room temperature and were permeabilized in 0.5 % Triton X-100 solution for 5 min at 4 °C. Primary and secondary antibody incubations were performed for 40 and 20 min at 37 °C, respectively. Anti-γ-$H2AX^{ser139}$ antibody (clone JBW301; Merck, Millipore, Darmstadt, Germany) was applied at 1:800. Anti-$pATM^{ser1981}$ (clone 10H11.E12; Millipore), anti-*MRE11* (#56211; QED Bioscience Inc., San Diego, CA), and anti-*HTT* (3H2241; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa-Cruz, CA) antibodies were used at 1:100. Incubations with anti-mouse IgG fluorescein conjugate (FITC) and anti-rabbit IgG rhodamine conjugate (TRITC) secondary antibodies developed in goat (Sigma, Saint Louis, MO) were performed at 1:100 at 37 °C for 20 min. Slides were mounted in 4′,6′-diamidino-2-phenyl-indole (DAPI)-stained Vectashield (Eurobio-Abcys, Courtaboeuf, France) and examined with an Olympus fluorescence microscope. DAPI staining permitted also to indirectly evaluate the yield of G_1 cells (nuclei with homogeneous DAPI staining), G_2 cells (nuclei with heterogeneous DAPI staining), and metaphase (visible chromosomes) [21]. In order to avoid any bias due to co-immunofluorescence, we have deliberately chosen to apply immunofluorescence with only one marker (separated immunofluorescence) [23].

Statistical Analysis

The DSB repair data were fitted to the so-called Bodgi's formula that describes the kinetics of the appearance/disappearance of nuclear foci formed by some protein relocalizing after genotoxic stress [19]. Briefly, the number of nuclear foci, $N(t)$, at a given dose D and a post-irradiation time t is given by

$$N(t) = ID\left(1-\frac{1}{1+b_{\mathrm{rec}}t}\right)^{a_{\mathrm{rec}}}\left(\frac{1}{1+b_{\mathrm{rep}}(t-t_0)}\right)^{a_{\mathrm{rep}}} \quad (2)$$

where

- I is the induced number of foci per Gy
- a_{rec} and b_{rec} are the recognition rate parameters
- a_{rep} and b_{rep} are the repair rate parameters
- t_0 represents the delay between the recognition and the repair process

Statistical analysis was performed using Kaleidagraph v4 (Synergy Software, Reading, PA).

Cell Extracts, Immunoblot, and Immunoprecipitation

Total extracts were obtained from cells with a RIPA buffer (50 mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8, 10 % glycerol, 0.2 % Nonidet NP40; Sigma) supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Sigma) and applied 20 min at 4 °C. Aliquots of extracts were stored at −70 °C and protein concentrations were measured with the BioRad Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA). Immunoprecipitations and immunoblotting procedures are described elsewhere [21]. Briefly, immunoprecipitations were performed with protein A-Sepharose beads (Millipore) and 30 μg precleared extracts. Immunoblottings were performed with cell extracts boiled in loading buffer and separated with standard SDS-PAGE. Liquid transfer system (BioRad) was used for transferring proteins to nitrocellulose membranes (45 min, 140 V;

Author's personal copy

Schleicher and Schuell, Dassel, Germany). Membranes were incubated with primary antibody for 1 h and with secondary antibody for 45 min. Antibody binding was revealed using an ECL kit (Amersham, Buckinghamshire, UK). Anti-*HTT* (precited) and anti-*ATM* (Ab-78) were purchased from Abcam (France, Paris).

Results

Localization and Expression of HTT in HD and Normal Fibroblasts After Irradiation

Since most of the DSB repair proteins translocate or are generally situated in the nucleus after irradiation, it was important to examine huntingtin localization under our conditions. While the localization of huntingtin was shown to be mainly expressed in the brain and localized in the cytoplasm [7, 24], a few reports, if any, described the localization of huntingtin in human quiescent skin fibroblasts. By using an anti-HTT antibody whose epitope is situated at amino acids 2703–2911 (i.e., outside the polyQ domain), huntingtin appeared spontaneously expressed in the cytoplasm in both HD and normal fibroblasts. After irradiation at 2-Gy or even 4-Gy γ-rays followed by 0–24 h incubation, huntingtin essentially remains in the cytoplasm in all the cell lines tested (Fig. 1). It is noteworthy that some nuclear-positive staining was observed, but it was not specific of any particular condition and represents a negligible contribution of the whole HTT expression. Altogether, our data suggest that HTT is expressed significantly in human skin fibroblasts and that huntingtin remains in the cytoplasm, independently of the HTT status and the dose of radiation (Fig. 1).

HTT Mutations Lead to Impairments in Chromatin Organization Caused by DNA Damage

The heterochromatin protein 1 (HP1) complex is involved in gene silencing and chromatin structure [25]. The HP1α and HP1β components of the HP1 complex are sensors of a number of DNA damage, essentially DNA single-strand breaks [26], which impact on both hetero- and euchromatin organization [27]. In order to examine whether HTT mutations impact on chromatin integrity, we assessed the kinetics of the appearance/disappearance of the HP1α and HP1β proteins as nuclear foci spontaneously and 0–30 min after irradiation. While the great majority of the fibroblasts tested were in the G_0/G_1 phase, a significant yield of HP1α and HP1β foci was observed in non-irradiated HD fibroblasts (5±0 HP1α foci and 35±10 HP1β foci in GM21757 vs. 0±0 HP1α foci and 4±1.5 HP1β foci in controls; Fig. 2a, b). Furthermore, after 2-Gy γ-rays, immunofluorescence analysis systematically showed more HP1α and HP1β foci in HD fibroblasts than in radioresistant controls, whatever the post-irradiation time. The results suggest that (1) HTT mutations may cause spontaneous single-strand breaks (SSB); (2) this feature is exacerbated after irradiation; and (3) since observations were performed with untransformed fibroblasts irradiated in the plateau phase of growth and observed at 0–30 min after irradiation, the production of such SSB cannot be the result of any cell cycle effect. Interestingly, spontaneous and radiation-induced SSB are not necessarily linked to cellular radiosensitivity, but very frequently to aging [28]. Conversely, unrepaired DSB are associated with radiosensitivity [17]. Hence, we focused

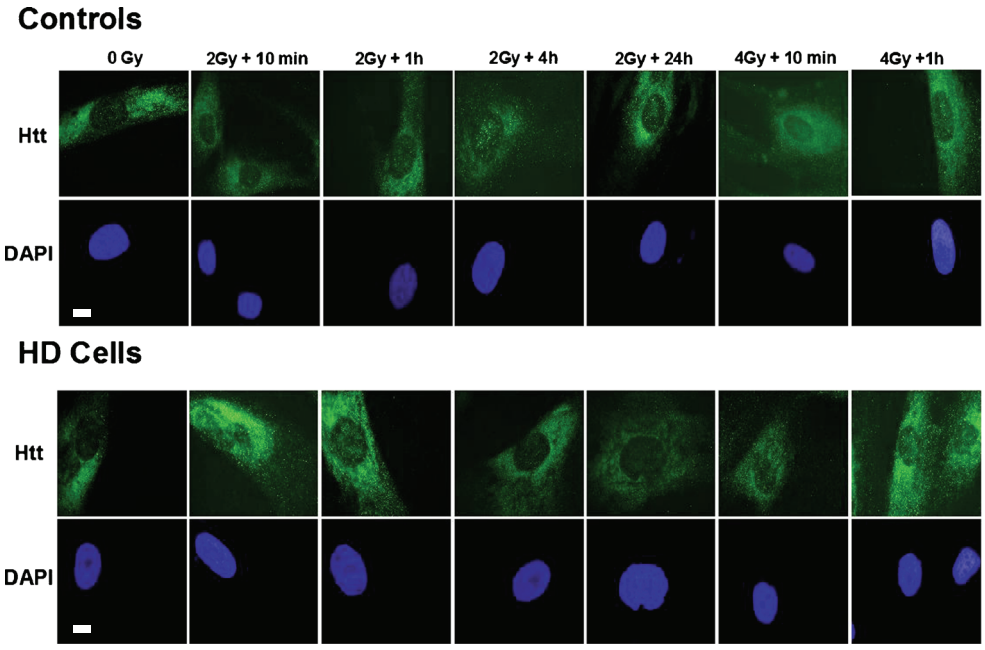


Fig 1 Localization of HTT observed by immunofluorescence in radioresistant (1BR3) and HD (GM21756) skin fibroblasts. Radiation dose and post-irradiation times are indicated in the picture. *White bar* represents 5 μm

Author's personal copy

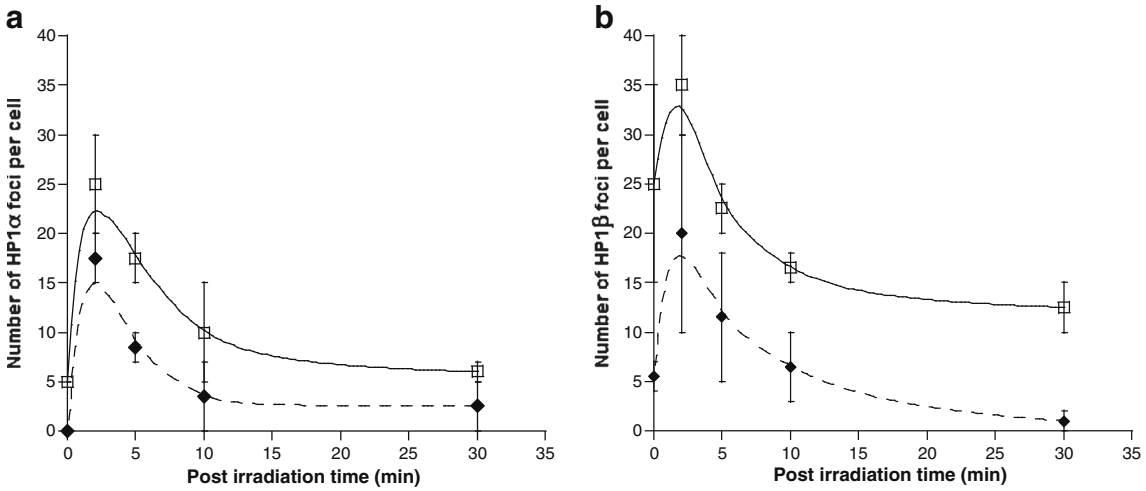


Fig 2 Kinetics of the appearance/disappearance of HP1α (**a**) and HP1β (**b**) foci in radioresistant and HD skin fibroblasts. The numbers of foci are plotted against post-irradiation time after a single dose of 2 Gy. Each plot represents the mean±SEM of three independent replicates (1BR3 cells, *closed diamonds*; GM21756, *open squares*)

thereafter on the functionality of DSB repair and signaling pathways in HD fibroblasts.

Unlike the HP1α and HP1β foci, radiation-induced micronuclei are likely to be the reflection of unrepaired DSB that propagate all along the cell cycle, leading to irreversibly damaged chromosomal fragments and causing mitotic death [29]. Interestingly, while untransformed fibroblasts do not show apoptosis, spontaneous micronuclei were observed in significantly higher proportion in HD cells than in radioresistant controls (0.5±0.1 and 4.55±0.55 micronuclei in 100 cells for controls and GM21757, respectively). The same conclusion was reached 24 h after irradiation (1.9±0.5 and 8.4±0.7 micronuclei in 100 cells for controls and GM21757, respectively). It is noteworthy that micronuclei are less numerous than HP1α and HP1β foci and that numerous SSB may be the indirect result of micronuclei formation.

HTT Mutations Lead to a Moderate But Significant Decrease of DSB Repair Rate

NHEJ is the major DSB repair and signaling pathway in both mammalian and quiescent cells [16]. We examined therefore the DSB recognized by the phosphorylation of H2AX (γ-H2AX), an early NHEJ DSB sensor. In our conditions, the number of spontaneous anti-γ-*H2AX* foci observed in the radioresistant controls was not significantly different from those assessed in the two HD fibroblasts (0.2±0.5 vs. 0.5±0.4 γ-*H2AX* foci per cell, respectively; $p=0.1$). It is noteworthy that, even if some HD cells may elicit larger nuclei than controls, the average nuclei size is similar in HD and control cells.

The anti-γ-*H2AX* immunofluorescence was applied to fibroblasts from HD patients after 2-Gy X-rays followed by 0–24 h of repair time (Fig. 3). In the radioresistant controls, the number of γ-H2AX foci scored immediately after 2 Gy was 74±9 per cell, in very good agreement with the value of 37±4 per Gy per cell published previously [17]. The number of radiation-induced γ-H2AX foci scored immediately after 2 Gy in the HD fibroblasts was systematically lower than that in radioresistant cells (46±6 and 80±5 foci per cell, respectively; $p<0.01$), suggesting that HTT mutations contribute to decrease the number of DSB that are recognized by the NHEJ pathway. HD fibroblasts also showed a significantly higher amount of persistent γ-H2AX foci 24 h after irradiation than radioresistant controls (GM21756, 2.8±0.15; GM21757, 3±0.14 foci per cell; controls, 0.8±0.4 γ-H2AX foci, respectively), suggesting that HTT mutations contribute to decrease the DSB repair rate ($p<0.01$), as well. The ATM- and LIG4-mutated fibroblasts are the most hyper-

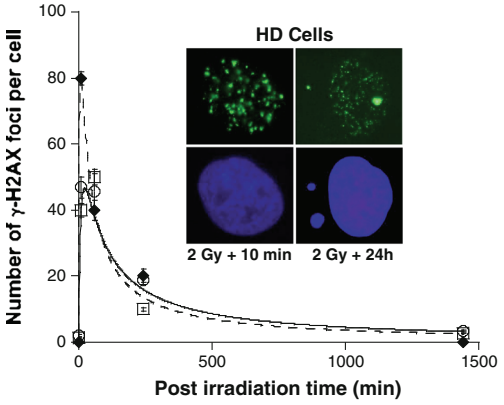


Fig 3 Kinetics of the appearance/disappearance of γ-H2AX foci in radioresistant and HD skin fibroblasts. The numbers of foci are plotted against post-irradiation time after a single dose of 2 Gy. Each plot represents the mean±SEM of three independent replicates, at least (1BR3 cells, *closed diamonds*; GM21757, *open circles*; GM21756, *open squares*). *Insert*, Representative examples of nuclei stained by γ-H2AX antibodies and counterstained by DAPI at indicated conditions

Author's personal copy

radiosensitive cells in humans. A rapid comparison of the kinetics of radiation-induced γ-H2AX foci demonstrates that the delay observed in the DSB repair rate of HD cells is moderate in comparison with that of the ATM- and LIG4-mutated fibroblasts (Fig. 4a).

The Yield of Unrepaired DSB in HD Cells Is Correlated with Clonogenic Survival

Clonogenic cell survival assays are considered as the "gold standards" of radiobiology to evaluate radiosensitivity [30]. When applied to representative untransformed fibroblasts ($ATM^{-/-}$, $LIG4^{-/-}$, HD, and radioresistant controls), it appears that HD cells show a significant but moderate radiosensitivity (Fig. 4b). When data are fitted to the linear-quadratic model, the α and β values were found to be $\alpha = 0.405 \pm 0.019$ Gy^{-1} and $\beta = 0.038 \pm 0.009$ Gy^{-2} for HD cells, which correspond to a moderate radiosensitivity similar to Xeroderma pigmentosum, Cockayne's and Bloom's syndromes [17].

Altogether, abnormal yields of micronuclei and residual DSB strongly suggest cellular radiosensitivity. In 2008, we pointed out a quantified correlation between clonogenic cell survival at 2 Gy (SF2) and unrepaired DSB assessed after 2 Gy followed by 24-h repair from a collection of 40 untransformed human fibroblasts showing a wide range of radiosensitivity. An unrepaired DSB range of 0–10 % corresponds to an SF2 range of 10–80 %, explaining why even a low amount of unrepaired DSB can lead to significant radiosensitivity [17]. When survival data were plotted against the yield of unrepaired DSB, HD cells obey the general correlation described elsewhere (Fig. 4c). From the definition of three radiosensitivity groups of cells described previously [17, 27], the HD fibroblasts tested here belong to group II, associated with a weak

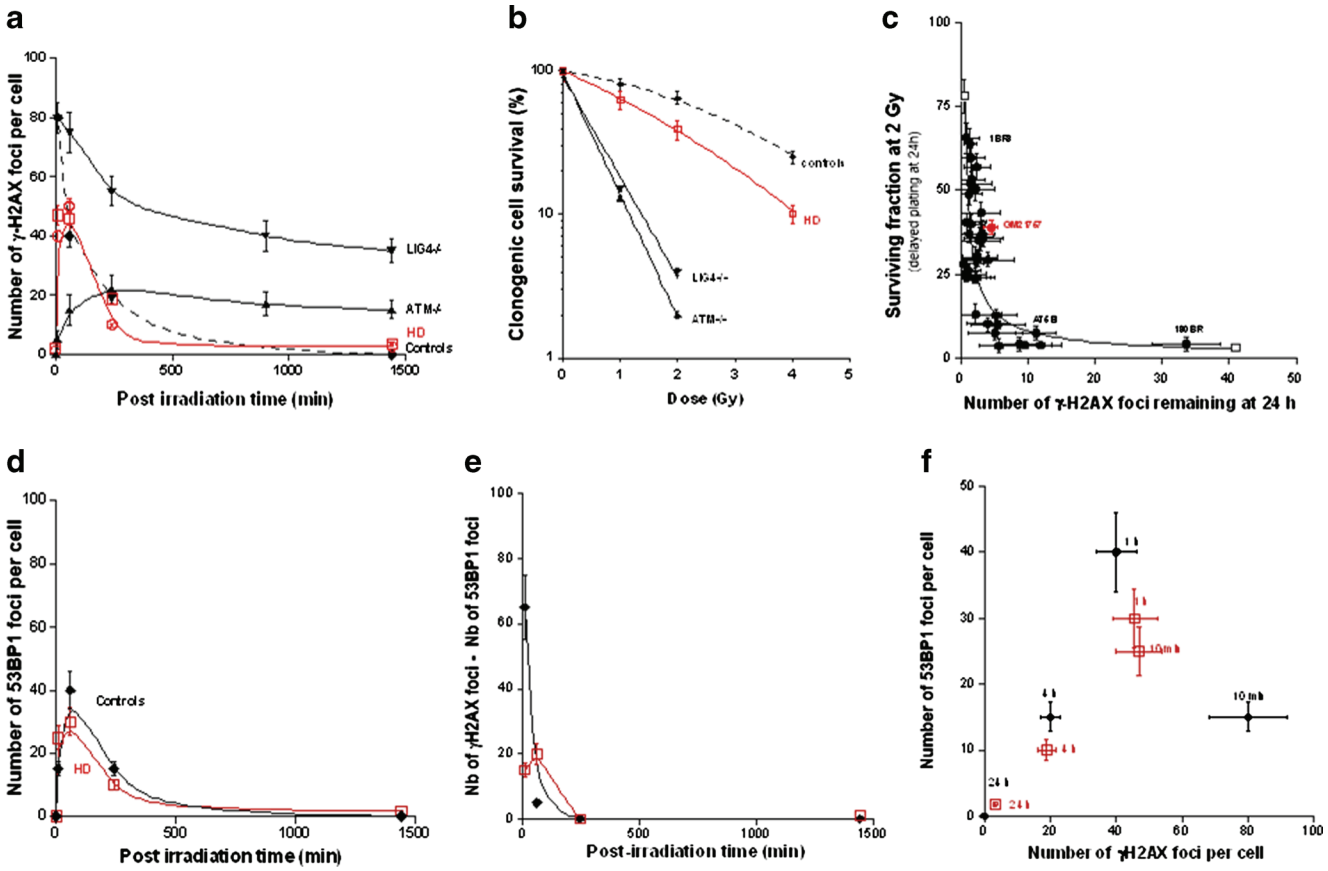


Fig 4 Correlation between DSB repair defect and clonogenic cell survival. **a** Representative kinetics of the appearance/disappearance of γ-H2AX foci in radioresistant (1BR3, *closed diamonds*); HD (GM21757, *open circles*; GM21756, *open squares*); $ATM^{-/-}$ (AT5BI, *closed triangles*); and $LIG4^{-/-}$ (180BR, *inverted closed triangles*) skin fibroblasts after a single dose of 2 Gy. Each plot represents the mean±SEM of three independent replicates, at least. **b** Clonogenic cell survival at the indicated doses obtained from cell lines detailed in (**a**). **c** Correlation cell survival at 2 Gy (SF2) and the number of γ-H2AX foci remaining after 2 Gy+24 h in a large collection of skin fibroblasts described elsewhere [17] and including those characterized in (**a**). **d** Kinetics of the appearance/disappearance of 53BP1 foci in radioresistant (1BR3, *closed diamonds*) and HD (GM21756, *open squares*) skin fibroblasts after a single dose of 2 Gy. Each plot represents the mean±SEM of two independent replicates, at least. **e** The number of γ-H2AX foci minus the number of 53BP1 foci described in (**a**) and (**d**), respectively, was plotted against post-irradiation time. **f** The number of 53BP1 foci described in (**d**) was plotted against the corresponding number of γ-H2AX foci described in (**a**) for the same post-irradiation time

Author's personal copy

but significant radiosensitivity with a moderate defect in repair of DSB recognized by NHEJ pathway.

HTT Mutations Impair the Kinetics of Radiation-Induced 53PB1 Foci

The 53BP1 protein is known to localize as nuclear foci early after irradiation [31]. In 2008, by applying separated immunofluorescence, we have shown that the kinetics of the radiation-induced 53BP1 foci do not overlap those of pDNA-PK, MDC1, and γ-H2AX foci [17]. Particularly, 10 min after 2 Gy, only 15 53BP1 foci per Gy per cell were observed by immunofluorescence in radioresistant human fibroblasts, while 80 were scored with γ-H2AX antibodies. In radioresistant controls, the yield of 53BP1 foci reached their maximum at 1 h post-irradiation and decreased progressively at 24 h. The rate of disappearance of 53BP1 foci was found to be similar to that of γ-H2AX foci at 4–24 h only (Fig. 4d). Interestingly, the number of 53BP1 foci in irradiated HD cells was found significantly higher at 10 min post-irradiation ($p < 0.05$), but similar to that of controls from 4 to 24 h post-irradiation (Fig. 4d, e). By considering the 53BP1/γ-H2AX ratio of the number of foci, it appeared that it is independent of the repair time in HD cells, unlike controls (Fig. 4f). Altogether, these data suggest that HTT mutations impair the kinetics of radiation-induced 53BP1 foci.

HTT Mutations Delay the Nucleo-shuttling of ATM in Response to Radiation

Since the number of γ-H2AX foci scored immediately after irradiation was found systematically lower in HD fibroblasts than in radioresistant controls, we evaluated therefore the activity of ATM, the major kinase responsible for the radiation-induced phosphorylation of H2AX histone, using immunofluorescence with antibodies against the autophosphorylation of ATM ($pATM^{ser1981}$) [32]. In non-irradiated controls, pATM forms were found to be cytoplasmic. An exposure to 2 Gy resulted in an early formation of pATM foci in the nucleus: more than 40 pATM foci were observed at 10 min after irradiation. This number of nuclear foci progressively decreased with repair time and reached 2.7±1.4 pATM foci per cell at 24 h after irradiation. In HD fibroblasts, the number of pATM foci per cell observed 10 min post-irradiation was found significantly lower with a broad intense nuclear staining (GM21757, 23±7; GM21756, 0±5; and 1BR3, 43.8±8 pATM foci per cell; $p < 0.01$; Fig. 5). Furthermore, the kinetics of the appearance/disappearance of pATM foci were found to be significantly different from that of radioresistant cells, with a maximum reached between 1 and 4 h post-irradiation. Since huntingtin remains in the cytoplasm even after irradiation, our data cannot be explained by a direct action of huntingtin on ATM kinase activity in the nucleus. An alternative explanation would be that HTT mutations may lead to the sequestration of ATM forms in the cytoplasm, delaying therefore the nucleo-shuttling of the ATM kinase and preventing the recognition and the repair of DSB by the NHEJ pathway.

Mutated Huntingtin Is a Substrate of ATM in the Cytoplasm Only

To verify this last assumption, ATM immunoprecipitation was performed on whole protein cell extracts of HD (GM21756) and untransformed (155BR) and transformed radioresistant 1BR3neo fibroblasts. While the ATM protein was found to

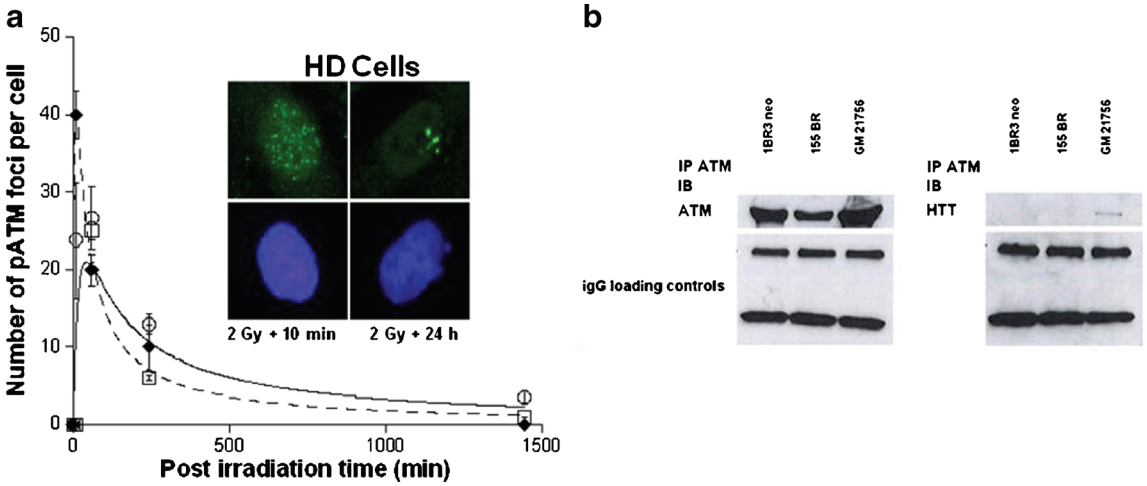


Fig 5 Kinetics of the appearance/disappearance of pATM foci in radioresistant and HD skin fibroblasts. **a** The numbers of foci are plotted against post-irradiation time after a single dose of 2 Gy. Each plot represents the mean±SEM of three independent replicates (1BR3 cells, *closed diamonds*; GM21757, *open circles*; GM21756, *open squares*). *Insert*, Representative examples of nuclei stained by pATM antibodies and counterstained by DAPI. **b** ATM immunoprecipitates from 1BR3, 1BR3neo, and GM21756 fibroblasts were plotted against anti-*ATM* and anti-*HTT* antibodies. Heavy and light chain of IgG served as loading controls

Author's personal copy

be present at a similar extent in the three cell lines, the huntingtin protein was found only in the ATM immunoprecipitates provided from HD cells (Fig. 5b). This last result indicates that (1) ATM spontaneously binds to mutated but not wild-type huntingtin and that (2) since huntingtin, whether mutated or not, is essentially expressed in the cytoplasm, the ATM-huntingtin interaction occurs essentially in the cytoplasm.

HTT Mutations Lead to Abnormally High MRE11 Activity After Irradiation

The ATM kinase was shown to phosphorylate a number of protein substrates involved in the cascade of molecular events that follows an irradiation. This is notably the case of MRE11 protein, an exonuclease component of the RAD50-MRE11-NBS1 complex that forms nuclear foci and contributes to produce DNA breaks [17]. In the radioresistant controls, MRE11 foci appeared from 2 to 8 h after 2 Gy and reached their maximal yield at 4 h (Fig. 6). Interestingly, the two HD fibroblasts showed an earlier occurrence of radiation-induced MRE11 foci (reached at about 10 min after 2 Gy) and with a higher number of foci (GM21756, 4±2; GM21757, 4.33±2.1 vs. controls, 1.3±0.4; $p<0.01$). Lastly, the numbers of MRE11 foci remaining 24 h after irradiation in HD cells were also higher than in the radioresistant controls. Altogether, these findings support that HTT mutations can potentially cause an abnormally high stimulation of the MRE11 nuclease, favoring, therefore, genomic instability throughout the production of DNA breaks.

Genotoxic Effect of HTT Mutations Can Be Alleviated by Statin and Biphosphonate Treatment

A statin (pravastatin) and a bisphosphonate (zoledronate) in association (ZOPRA) can inhibit membrane farnesylation of the nucleus and could lead to an increased speed of ATM nucleo-shuttling [22]. We investigated the effect of ZOPRA treatment to the previously defined molecular endpoints. With regard to spontaneous micronuclei, 1.6±0.24 micronuclei per 100 cells were observed in treated GM21757 cells (instead of 4.55±0.55 in untreated cells and 0.5±0.1 in radioresistant controls). With regard to radiation-induced micronuclei assessed 24 h after 2 Gy, 3.0±0.6 micronuclei per 100 cells were observed in treated GM21757 cells (instead of 8.4±0.7 in untreated cells and 1.9±0.5 in radioresistant controls).

ZOPRA treatment does not affect the kinetics of γ-H2AX foci appearance in control cells (data not shown). Conversely, in GM21756 and GM21757 cells treated with ZOPRA, the number of γ-H2AX foci after 10 min was found similar to that of control cells, suggesting that the recognized DSB almost doubled (65±4 vs. 40±4 γ-H2AX foci for GM21756 and 71±1.2 vs. 46±3 γ-H2AX foci for GM21757; Fig. 7a). If ZOPRA treatment does not affect the appearance of pATM foci in control cells, it significantly improves ATM nucleo-shuttling in GM21757 cells (36±3 pATM foci after 2 Gy and 10 min vs. 23±7 without ZOPRA; 2±0.8 pATM foci after 2 Gy and 24 h vs. 3±0.7 without ZOPRA) and in GM21756 cells (40±0.2 pATM foci after 2 Gy+10 min vs. 23±7 without ZOPRA and 0±0.3 pATM foci after 2 Gy and 24 h vs. 1±0.7 without ZOPRA; Fig. 7b). The complementation of the ATM nucleo-shuttling impairment must lead to an early phosphorylation of H2AX after irradiation and increases DSB detection and repair. Concerning MRE11, ZOPRA tends to bring together the results of GM21757 and 1BR3 control cells (Fig. 7c).

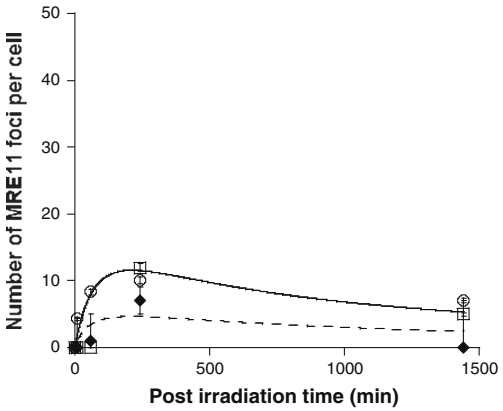


Fig 6 Kinetics of the appearance/disappearance of MRE11 foci in radioresistant and HD skin fibroblasts. The numbers of foci are plotted against post-irradiation time after a single dose of 2 Gy. Each plot represents the mean±SEM of three independent replicates (1BR3 cells, *closed diamonds*; GM21757, *open circles*; GM21756, *open squares*)

Discussion

HD Is Associated with a Moderate Cellular Radiosensitivity Linked to Impairment of the ATM-Dependent DSB Repair and Signaling Pathways

The reports reviewed in Table 1 support HD being generally associated with a moderate cellular radiosensitivity in quiescent cells. The data presented here are in good agreement with the literature data presented in Table 1. The cellular radiosensitivity of HD is similar to that of syndromes such as Xeroderma pigmentosum, Fanconi anemia, Cockayne's or Bloom's syndromes. However, all the other clinical features of these syndromes are not necessarily in common with those of HD [15, 17]. While ionizing radiation induce a number of different types of DNA damage, only DSB (but not SSB) repair impairment leads to cellular radiosensitivity in humans. In 2008, we observed that syndromes associated with moderate radiosensitivity are also characterized by a low but significant yield of unrepaired DSB. An inverse correlation between cellular radiosensitivity and the yield of unrepaired DSB was

Author's personal copy

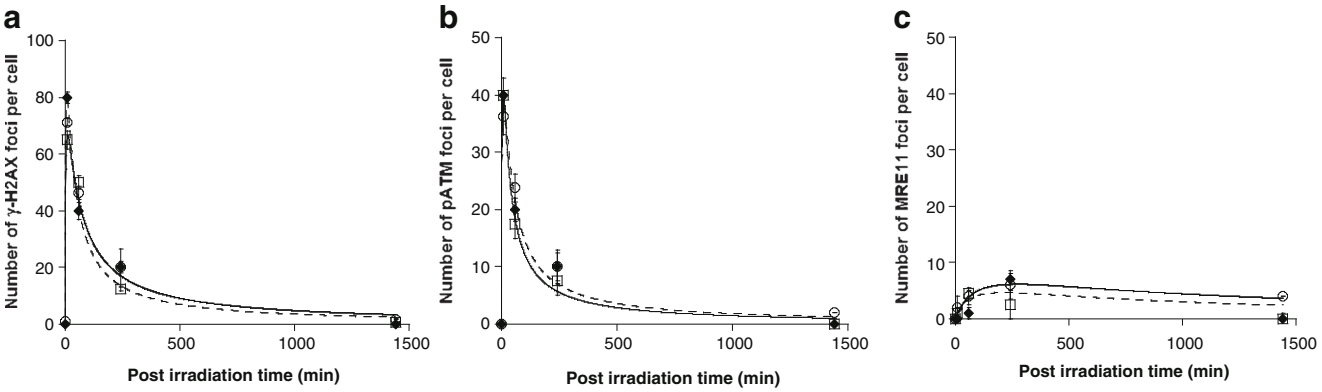


Fig 7 Statin and bisphosphonate increase the radiosensitivity observed in HD cells. Kinetics of the appearance/disappearance of γ-H2AX (**a**), pATM (**b**), and MRE11 (**c**) in ZOPRA-treated radioresistant (*closed diamonds*) and HD (GM21756, *open squares*; GM21757, *open circles*) skin fibroblasts. Each plot represents the mean±SEM of three independent replicates

reported, and the data presented here are in agreement with such a correlation [17] (Fig. 4). At this stage, it must be stressed that even a small number of unrepaired DSB is sufficient to induce a lethal event. Cornforth and Bedford [33], in 1987, already showed that one unrepaired chromosome break per cell is responsible for the radiation-induced death of quiescent human fibroblasts. Under our conditions, any hypothetical change in the cell cycle distribution cannot explain these data (see "Materials and Methods"). Hence, the radiosensitivity of HD is likely to be caused by impairment of DSB management by pathways active in the G_0/G_1 phase.

The ATM-dependent γ-H2AX phosphorylation is an early event of the recognition and repair of DSB managed by NHEJ, the major DSB repair pathway in mammalians active in G_0/G_1 cells. Since huntingtin, whether mutant or normal, appears only in the cytoplasm, the DSB repair impairments observed in HD fibroblasts cannot be the result of a direct action of huntingtin in the nucleus. However, our data show abnormal pATM foci kinetics after irradiation, suggesting that a functional huntingtin in the cytoplasm is required for a normal ATM kinase activity in the nucleus. One of the most relevant models is based on the hypothesis of a nucleo-shuttling of

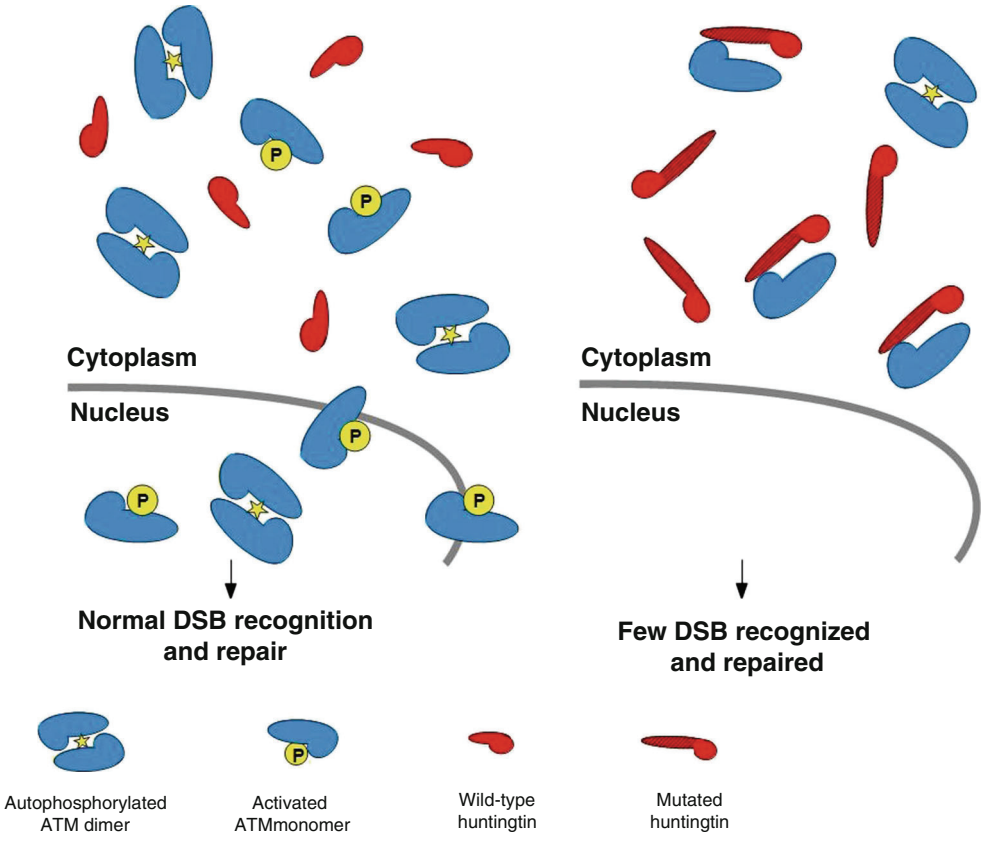


Fig 8 Mechanistic model for HD cells. We hypothesized that ATM is essentially formed by autophosphorylated ATM dimers in the cytoplasm. Irradiation produces DSB in the nucleus and oxidizes ATM dimers that cause monomerization. Such a monomerization facilitates the nucleo-shuttling of ATM that permits the recognition and repair of DSB and inhibition of the nuclease activity of MRE11 protein. In HD cells, the mutated huntingtin traps ATM monomers in the cytoplasm, decreasing therefore the nucleo-shuttling of ATM and explaining the radiosensitivity and efficiency of ZOPRA treatment

Author's personal copy

ATM caused by radiation that would be prevented by an interaction between ATM and huntingtin. The ATM immunoprecipitate data support this hypothesis. More precisely, the pATM forms were suggested to be dimeric spontaneously [32]. Hence, we hypothesized that ATM in monomeric (non-phosphorylated) and dimeric (trans-phosphorylated) forms coexist both in the cytoplasm and nucleus (Fig. 8). A sufficient dose of radiation may cause the monomerization of pATM dimers in the cytoplasm and thereafter facilitate the diffusion of monomers in the nucleus, where ATM phosphorylates γ-H2AX on DSB sites. Interestingly, huntingtin holds a number of SQ and TQ domains, known to be preferentially phosphorylated by ATM [21]. Some of these domains are situated at the vicinity of the nuclear localization site. However, the observation that only the mutated huntingtin forms interact with ATM suggests that the binding site would be situated in the polyQ HTT domain rather than on the wild-type sequence. Further experiments are needed to determine the precise domains of interaction.

Interestingly, it was shown that the induction of DNA damage response precedes the appearance of visible mutant huntingtin aggregates. However, care must be taken since this observation was performed with rodent cells [34]. Furthermore, it was recently shown that BRCA1 directly modulates the dynamics of γ-H2AX upon genotoxic stress in HD cells. Although such conclusion was also reached with rodent cells, it is compatible with our model [35].

HD Is Associated with Chromatin Disorganization Due to DSB and Some Other DNA Damage

The HD fibroblasts show impressive yields of MRE11 foci, suggesting a deregulation not only in DSB but also in SSB repair. Furthermore, HP1 data suggest that, even spontaneously, HD cells are characterized by high oxidative stress due to SSB or base damage (BD). However, the number of spontaneous γ-H2AX foci reflecting DSB was found to be not statistically different from that of radioresistant controls. DNA damage different from DSB (like SSB or BD) does not cause radiosensitivity, but may contribute significantly to senescence and aging. Interestingly, among genetic syndromes whose cellular radiosensitivity is similar to HD, Cockayne's B syndrome shares a number of biological and clinical features with HD: moderate radiosensitivity, low but significant yields of unrepaired DSB, high MRE11 activity, delayed nucleo-shuttling, and neurodegeneration [17, 36]. Further investigations are needed to verify whether the huntingtin and CS proteins interact in the cytoplasm.

Consequences of Our Results in the Clinic

ATM was shown to be an important cytoplasmic protein in neuron cells whose absence leads to lysosomal accumulation [37]. Hence, it is likely that the impairments observed in HD skin fibroblasts are exacerbated in neurons or other brain cellular models. If ATM also regulates oxidative stress in the cytoplasm, ZOPRA treatment may be an encouraging approach to diminish the toxicity due to HTT mutation. ZOPRA was shown to inhibit the nuclear membrane farnesylation of progerin, a mutant form of nuclear lamin A, and to permit correcting some biological features of cells from the progeroid Hutchinson–Gilford syndrome [22]. ZOPRA is composed of zoledronate, an anti-osteoporosis agent, and of statin, an anti-cholesterol drug [22]. While the corrective action of these two agents in HD cells is being described for the first time, their application may be justified by the clinical features of HD. Actually, some reports suggest that osteoporosis can also be a characteristic of HD, notably when HTT mutations cause decreased bone mineral density [4]. Similarly, the efficiency of statin reported here is in agreement with a number of reports showing that cholesterol homeostasis is dysregulated in HD cells [38, 39]. As an example, while the central nervous system is rich in cholesterol, HTT mutations may cause attenuated brain sterol synthesis and accumulation of cholesterol in neuronal membranes, leading to brain cell death. Hence, this report may represent one of the first biological justifications of a preventive application of both statin and bisphosphonates to HD patients. Obviously, further investigations, notably on brain cells, are needed to consolidate this assumption and to secure its clinical transfer.

Conclusions

Here, our findings suggest that quiescent HD fibroblasts are associated with a moderate but significant radiosensitivity associated with NHEJ impairment and a delay in nucleo-shuttling of ATM kinase. A combination with statin and bisphosphonate may have a corrective effect, notably by improving the nucleo-shuttling of ATM kinase. The fact that ATM is known to be essentially cytoplasmic in neurons suggests that the features described in this paper may be exacerbated in neurons, giving an important mechanistic element to explain the neurodegeneration observed in HD patients.

Acknowledgments We thank Madame Beaufrère for her assistance in editing the English. M.L.F. was supported by the Société Française de Radioprotection (SFRP). We thank the Association Pour la Recherche sur l'Ataxie-Telangiectasie (APRAT), the Electricité de France (Comité de Radioprotection), the Plan Cancer/AVIESAN "Micromegas project, the ANR "Hemi-breaks T" project, the Centre National d'Etudes Spatiales (CNES), and the Commissariat Général à l'Investissement (INDIRA project).

References

1. Huntington G (1872) On chorea. Med Surg Report 26(15):1
2. Zheng Z, Diamond MI (2013) Huntington disease and the huntingtin protein. Prog Mol Biol Transl Sci 107:189–214

Author's personal copy

3. Pringsheim T, Wiltshire K, Day L, Dykeman J, Steeves T, Jette N (2012) The incidence and prevalence of Huntington's disease: a systematic review and meta-analysis. Mov Disord 27(9): 1083–1091
4. van der Burg JM, Bjorkqvist M, Brundin P (2009) Beyond the brain: widespread pathology in Huntington's disease. Lancet Neurol 8(8): 765–774
5. Rubinsztein DC, Barton DE, Davison BC, Ferguson-Smith MA (1993) Analysis of the huntingtin gene reveals a trinucleotide-length polymorphism in the region of the gene that contains two CCG-rich stretches and a correlation between decreased age of onset of Huntington's disease and CAG repeat number. Hum Mol Genet 2(10):1713–1715
6. Rubinsztein DC, Leggo J, Barton DE, Ferguson-Smith MA (1993) Site of (CCG) polymorphism in the HD gene. Nat Genet 5(3):214–215
7. Cisbani G, Cicchetti F (2012) An in vitro perspective on the molecular mechanisms underlying mutant huntingtin protein toxicity. Cell Death Dis 3:e382
8. Jonson I, Ougland R, Larsen E (2013) DNA repair mechanisms in Huntington's disease. Mol Neurobiol 47:1093–1102
9. Enokido Y, Tamura T, Ito H, Arumughan A, Komuro A, Shiwaku H, Sone M, Foulle R, Sawada H, Ishiguro H, Ono T, Murata M, Kanazawa I, Tomilin N, Tagawa K, Wanker EE, Okazawa H (2010) Mutant huntingtin impairs Ku70-mediated DNA repair. J Cell Biol 189:425–443
10. Arlett CF (1980) Presymptomatic diagnosis of Huntington's disease? Lancet 1(8167):540
11. Arlett CF, Priestley A (1984) Deficient recovery from potentially lethal damage in some gamma-irradiated human fibroblast cell strains. Br J Cancer Suppl 6:227–232
12. Arlett CF, Muriel WJ (1979) Radiosensitivity in Huntington's disease. Heredity 42:276
13. Moshell AN, Tarone RE, Barrett SF, Robbins JH (1980) Radiosensitivity in Huntington's disease: implications for pathogenesis and presymptomatic diagnosis. Lancet 1(8158):9–11
14. McGovern D, Webb T (1982) Sensitivity to ionising radiation of lymphocytes from Huntington's chorea patients compared to controls. J Med Genet 19(3):168–174
15. Deschavanne PJ, Fertil B (1996) A review of human cell radiosensitivity in vitro. Int J Radiat Oncol Biol Phys 34(1): 251–266
16. Jeggo PA, Lobrich M (2007) DNA double-strand breaks: their cellular and clinical impact? Oncogene 26(56):7717–7719
17. Joubert A, Gamo K, Bencokova Z, Gastaldo J, Rénier W, Chavaudra N, Favaudon V, Arlett C, 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(2):1–19
18. Rothkamm K, Lobrich M (2003) 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(9):5057–5062
19. Bodgi L, Granzotto A, Devic C, Vogin G, Lesne A, Bottollier-Depois JF, Victor JM, Maalouf M, Fares G, Foray N (2013) A single formula to describe radiation-induced protein relocalization: towards a mathematical definition of individual radiosensitivity. J Theor Biol 333: 135–145
20. 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. Int J Radiat Biol 72(3):271–283
21. Foray N, Marot D, Gabriel A, Randrianarison V, Carr AM, Perricaudet M, Ashworth A, Jeggo P (2003) A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. EMBO J 22(11):2860–2871
22. 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 (2008) Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging. Nat Med 14(7): 767–772
23. Renier W, Joubert A, Bencokova Z, Gastaldo J, Massart C, Foray N (2007) Consequences of the bleed-through phenomenon in immunofluorescence of proteins forming radiation-induced nuclear foci. Int J Radiat Biol 83(8):543–549
24. Cattaneo E, Zuccato C, Tartari M (2005) Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. Nat Rev Neurosci 6(12):919–930
25. Maison C, Almouzni G (2004) HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. Nat Rev Mol Cell Biol 5(4):296–304
26. Dinant C, Luijsterburg MS (2009) The emerging role of HP1 in the DNA damage response. Mol Cell Biol 29(24):6335–6340
27. Nielsen AL, Oulad-Abdelghani M, Ortiz JA, Remboutsika E, Chambon P, Losson R (2001) Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. Mol Cell 7(4):729–739
28. Hegde ML, Mantha AK, Hazra TK, Bhakat KK, Mitra S, Szczesny B (2012) Oxidative genome damage and its repair: implications in aging and neurodegenerative diseases. Mech Ageing Dev 133(4): 157–168
29. Grote SJ, Joshi GP, Revell SH, Shaw CA (1981) 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(4):395–408
30. Fertil B, Malaise EP (1981) Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 7(5):621–629
31. Mochan TA, Venere M, DiTullio RA Jr, Halazonetis TD (2004) 53BP1, an activator of ATM in response to DNA damage. DNA Repair (Amst) 3(8–9):945–952
32. Bakkenist CJ, Kastan MB (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. Nature 421(6922):499–506
33. Cornforth MN, Bedford JS (1987) A quantitative comparison of potentially lethal damage repair and the rejoining of interphase chromosome breaks in low passage normal human fibroblasts. Radiat Res 111(3):385–405
34. Illuzzi J, Yerkes S, Parekh-Olmedo H, Kmiec EB (2009) DNA breakage and induction of DNA damage response proteins precede the appearance of visible mutant huntingtin aggregates. J Neurosci Res 87(3):733–747
35. Jeon GS, Kim KY, Hwang YJ, Jung M-K, An S, Ouchi M, Ouchi T, Kowall N, Lee J, Ryu H (2012) Deregulation of BRCA1 leads to impaired spatiotemporal dynamics of γ-H2AX and DNA damage responses in Huntington's disease. Mol Neurobiol 45:550–563
36. Lambert WC, Gagna CE, Lambert MW (2008) Xeroderma pigmentosum: its overlap with trichothiodystrophy, Cockayne syndrome and other progeroid syndromes. Adv Exp Med Biol 637:128–137
37. Barlow C, Ribaut-Barassin C, Zwingman TA, Pope AJ, Brown KD, Owens JW, Larson D, Harrington EA, Haeberle AM, Mariani J, Eckhaus M, Herrup K, Bailly Y, Wynshaw-Boris A (2000) ATM is a cytoplasmic protein in mouse brain required to prevent lysosomal accumulation. Proc Natl Acad Sci U S A 97(2):871–876
38. Valenza M, Rigamonti D, Goffredo D, Zuccato C, Fenu S, Jamot L, Strand A, Tarditi A, Woodman B, Racchi M, Mariotti C, Di Donato S, Corsini A, Bates G, Pruss R, Olson JM, Sipione S, Tartari M, Cattaneo E (2005) Dysfunction of the cholesterol biosynthetic pathway in Huntington's disease. J Neurosci 25(43):9932–9939

Author's personal copy

39. del Toro D, Xifro X, Pol A, Humbert S, Saudou F, Canals JM, Alberch J (2010) Altered cholesterol homeostasis contributes to enhanced excitotoxicity in Huntington's disease. J Neurochem 115(1):153–167
40. Beverstock GC, Simons JW (1982) Study on the variation in X-ray sensitivity of human diploid fibroblast. Normal radiosensitivity of cells derived from patients with Huntington's disease. Mutat Res 96: 75–87
41. Nove J, Tarone RE, Little JB, Robbins JH (1987) Radiation sensitivity of fibroblast strains from patients with Usher's syndrome, Duchenne muscular dystrophy, and Huntington's disease. Mutat Res 184(1):29–38

ARTICLE II

The American Journal of Pathology, Vol. ■, No. ■, ■ 2016

ELSEVIER

The American Journal of PATHOLOGY

ajp.amjpathol.org

COMMENTARY

Huntington Disease

A Disease of DNA Methylation or DNA Breaks?

Q10 Mélanie L. Ferlazzo and Nicolas Foray

From the INSERM, UMR 1052, Radiobiology Group, Cancer Research Centre of Lyon, Lyon, France

Q7 In this issue of *The American Journal of Pathology*, Mollica et al[1] proposed an interesting model to explain the clinical evolution of Huntington disease (HD); some DNA repair genes involved in the mismatch/loop out repair pathways (*BRCA1*, *APEX1*, *RPA1*, and *RPA3*) were shown to be down-regulated in mitotically active HD cells. The authors interpreted their findings by further hypothesizing that DNA methylation is responsible for this DNA repair gene down-regulation and leads to HD trinucleotide repeat region (TNR) instability in HD cells. According to Mollica et al,[1] epigenetics may help understand the specific features of HD cells.

DNA Methylation Is a Common Feature of Neurodegenerative Diseases

R.D. Hotchkiss showed in 1948 that DNA can be methylated at the 5-position of cytosine.[2] Progressively, the major neurodegenerative diseases were associated with abnormal DNA methylation of some critical genetic loci. However, the exact nature of the link between neurodegeneration and impaired DNA methylation must be discussed. The findings of Mollica et al[1] strengthen the discrepancies of literature: is DNA hypermethylation or hypomethylation associated with neurodegeneration and TNR instability? With regard to neurodegenerative syndromes, the cytidines were shown to be hypermethylated; however, the whole genome is rather hypomethylated in HD cells. In amyotrophic lateral sclerosis cells, the promoter regions of *VEGF* are hypomethylated, whereas those of *ATXN2* are hypermethylated.[3] With regard to TNR stability, the DNA methyltransferase inhibitor 5-azacytidine, like cytosine arabinoside, ethidium bromide, and aspirin, increases hypomethylation, and increases the TNR stability from 35% to 75%.[4] Conversely, the same drug provided clues that hypomethylation increases TNR instability.[5] The last report and the observations that: i) demethylation by treatment with 5-azacytidine increases the frequency of sister-chromatid exchange[6]; ii) mutations in several DNA methytransferases lead to hypomethylation and increase genomic instability[7]; iii) DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates,[7] are in contrast to the findings of Mollica et al[1] obtained with 5-azacytidine. The reasons for these discrepancies are not in the scope of this commentary, but they may concern the choice of cellular models and the endogenous levels of DNA methylation. Nevertheless, all these studies, including the one by Mollica et al,[1] conclude that highly unstable expanded simple sequence repeats may act as sensitive reporters of DNA damage.

DNA Damage in HD

HD is caused by mutations of the huntingtin protein that Q8 lead to TNR and generate polyglutamine (polyQ).[8] PolyQ expansion is associated with oxidative stress. Normal huntingtin is required in the base excision repair synthesis and the mismatch repair pathways that manage base damage and DNA adducts, respectively.[9] In addition, base damage and DNA adduct repair is important in neurodegenerative

Supported by the Association Pour la Recherche sur l'Ataxie-Telangiectasie, the Electricité de France (Comité de Radioprotection), the Plan Cancer/AVIESAN Micromegas project, the Centre National d'Etudes Spatiales, and the Commissariat Général à l'Investissement (INDIRA project). Q1 Q2 Q3 Q4

Accepted for publication May 10, 2016.

Disclosures: N.F. is a scientific adviser of the Neolys Diagnostics company.

Address correspondence to Nicolas Foray, INSERM UMR 1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Groupe de Radiobiologie, Bât Cheney A 1er etage, 28 Rue Laennec, 69008 Lyon, France. E-mail: Q5 Q6 nicolas.foray@inserm.fr

Copyright © 2016 Published by Elsevier Inc. on behalf of the American Society for Investigative Pathology.
http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.05.001

UNCORRECTED PROOF

diseases, as reported for approximately 15 neurological disorders, including HD.[10]

However, there are other types of DNA damage, like single-strand breaks and double-strand breaks (DSBs), that may be involved in the progression of the HD disease[11,12] and more generally in neurological diseases.[13,14] Radiosensitivity is one specific clinical feature of HD that is mentioned rarely.[15–20] Defects in base damage and DNA adduct repair are generally associated with photosensitivity, chemosensitivity, and eventually aging, but not necessarily with radiosensitivity.[20] Conversely, there is a large body of evidence that unrepaired DSBs are the key elements of radiosensitivity.[21] Besides, DSB repair defect is also compatible with neurodegeneration and aging.[22,23] The role of huntingtin protein in DSB repair must be therefore documented.

HD: Are Cycling Cells the Best Cellular Model?

In humans, DSBs are repaired by two major pathways: the nonhomologous end-joining (NHEJ), generally active in G_0/G_1 (quiescent) cells, and the homologous recombination, generally active in S-G_2/M (proliferating) cells. Because most human cells are quiescent (in children and adults), the NHEJ is the major DSB repair pathway.[24] This statement is particularly verified in brain cells in which the proliferation rate is limited during life. Consequently, quiescent cells appear to be the most appropriate cellular model to study neurodegenerative disease. DSBs managed by NHEJ can be detected by the nuclear foci formed by the ATM-dependent phosphorylation of the variant histone H2AX (γ-H2AX), easily quantifiable by using immunofluorescence. The γ-H2AX, ATM proteins are therefore natural sensors of the NHEJ efficiency.[25] Conversely, the BRCA1, APEX1, RPA1, and RPA3 proteins, involved in the replication forks, are more active in proliferating cells than in quiescent cells,[1] but are not required for normal NHEJ.[26]

HD: A Representative Example of a Radiosensitive Disease Caused by Mutations of Cytoplasmic Protein

Whether mutated or not, the human huntingtin protein is mainly cytoplasmic.[12] It is difficult to explain the consequences of a mutated cytoplasmic protein to the DNA surveillance machinery without indirect mechanisms or protein

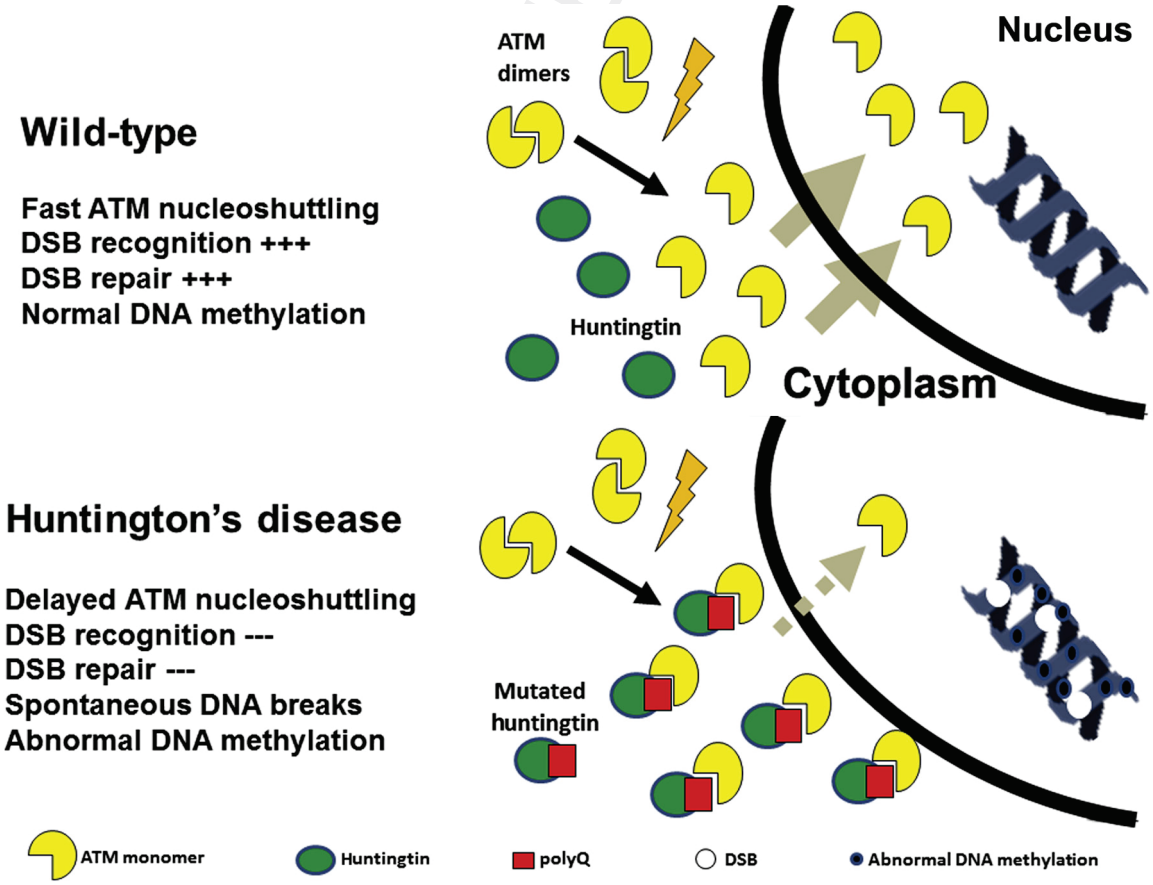


Figure 1 Model of ATM nucleoshuttling. Significant genotoxic stress (eg, ionizing radiation) induces monomerization of ATM, which facilitates its diffusion in nucleus. Once in nucleus, double-strand breaks (DSBs) are recognized and repaired. In the case of Huntington disease cells, the mutated huntingtin protein binds to ATM, which delays its nucleoshuttling. Consequently, spontaneous DNA breaks and abnormal DNA methylation rate are observed.

print & web 4C/FPO

SCO 5.4.0 DTD ■ AJPA2357_proof ■ 21 May 2016 ■ 4:01 am ■ EO: AJP16_0151

nucleoshuttling. Recently, by using a collection of 117 fibroblast cell lines showing a large spectrum of radiosensitivity, we pointed out that the ATM protein is mainly cytoplasmic in its dimeric form. Oxidative stress induced by ionizing radiation triggers the monomerization of ATM dimers, which facilitates its diffusion in nucleus. Once in nucleus, ATM participates in the recognition of DSB via the phosphorylation of H2AX and triggers DSB repair. In radiosensitive cases, some cytoplasmic proteins can bind to ATM and delay the ATM nucleoshuttling (Figure 1). The slower the ATM nucleoshuttling, the higher the radiosensitivity.[27,28] Interestingly, a delay in the ATM nucleoshuttling is also associated with genomic instability, spontaneous DNA damage, aging, neurodegeneration, and/or cancer risk.[27,29] Mutated huntingtin was shown to bind to ATM, likely through its TNR. PolyQ HD cells elicit significant delay in the radiation-induced ATM nucleoshuttling.[12] This mechanistic model was also consolidated by the use of statins and biphosphonates that both accelerate the ATM diffusion in nucleus and decrease the radiosensitivity of HD cells.[12] It is noteworthy that similar observations were performed with progeroid cells[30] and that the role of cytoplasmic ATM forms was also highlighted for cells from tuberous sclerosis patients.[31] Finally, the fact that ATM may be essentially cytoplasmic in neurons suggests that the nucleoshuttling model described herein may be exacerbated in brain cells, giving an important mechanistic element to explain the neurodegeneration linked to HD.[32] Hence, because HD belongs to the group of radiosensitive syndromes, we proposed a model in which the nucleoshuttling of the ATM kinase is delayed by mutated huntingtin protein in cytoplasm (Figure 1).[12]

Conclusions

Is the ATM nucleoshuttling model compatible with the hypotheses developed by Mollica et al?[1] Interestingly, the ATM-mutated cells are heavily hypomethylated, suggesting that ATM is involved in the methylation process.[33] Furthermore, fibroblasts from immunodeficiency, centromeric region instability, facial anomalies (ICF) syndrome, associated with mutations in the DNA methytransferase 3b (*DNMT3b*) gene, show a significant delay in the ATM nucleoshuttling (Ferlazzo et al, unpublished data). Altogether, these data are consistent with a general model illustrated in Figure 1 in which: i) the mutations of the huntingtin lead to the formation of TNR polyQ expansion, ii) the resulting TNR polyQ domain binds to ATM in cytoplasm, which delays its diffusion in nucleus, iii) the relative absence of ATM in nucleus decreases the capacity of DSB repair, which leads to radiosensitivity in case of exposure to ionizing radiation, iv) the relative absence of ATM in nucleus also favors DNA hypomethylation of the wide genome and overexpression of some DNA repair genes, like those studied by Mollica et al.[1]

The findings of Mollica et al[1] are particularly helpful to evaluate the epigenetic features of HD cells. Further investigations are needed to verify the relevance of their data and of the general model illustrated in Figure 1. Particular care should be taken in the choice of cellular model, the quantification of DNA methylation, and the DNA repair gene to be studied.

References

1. Mollica PA, Reid JA, Ogle RC, Sachs PC, Bruno RD: DNA methylation leads to DNA repair gene down-regulation and trinucleotide repeat expansion in patient derived Huntington's disease cells. Am J Pathol 2016, [in press] doi:10.1016/j.ajpath.2016.03.014
2. Hotchkiss RD: The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. J Biol Chem 1948, 175:315–332
3. Lu H, Liu X, Deng Y, Qing H: DNA methylation, a hand behind neurodegenerative diseases. Front Aging Neurosci 2013, 5:85
4. Gomes-Pereira M, Monckton DG: Chemically induced increases and decreases in the rate of expansion of a CAG*CTG triplet repeat. Nucleic Acids Res 2004, 32:2865–2872
5. Gorbunova V, Seluanov A, Mittelman D, Wilson JH: Genome-wide demethylation destabilizes CTG.CAG trinucleotide repeats in mammalian cells. Hum Mol Genet 2004, 13:2979–2989
6. Haaf T: The effects of 5-azacytidine and 5-azadeoxycytidine on chromosome structure and function: implications for methylation-associated cellular processes. Pharmacol Ther 1995, 65:19–46
7. Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R: DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. Nature 1998, 395:89–93
8. Zheng Z, Diamond MI: Huntington disease and the huntingtin protein. Prog Mol Biol Transl Sci 2013, 107:189–214
9. Jonson I, Ougland R, Larsen E: DNA repair mechanisms in Huntington's disease. Mol Neurobiol 2013, 47:1093–1102
10. Subba Rao K: Mechanisms of disease: DNA repair defects and neurological disease. Nat Clin Pract Neurol 2007, 3:162–172
11. Enokido Y, Tamura T, Ito H, Arumughan A, Komuro A, Shiwaku H, Sone M, Foulle R, Sawada H, Ishiguro H, Ono T, Murata M, Kanazawa I, Tomilin N, Tagawa K, Wanker EE, Okazawa H: Mutant huntingtin impairs Ku70-mediated DNA repair. J Cell Biol 2010, 189:425–443
12. 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. Mol Neurobiol 2014, 49:1200–1211
13. Nahas SA, Gatti RA: DNA double strand break repair defects, primary immunodeficiency disorders, and "radiosensitivity". Curr Opin Allergy Clin Immunol 2009, 9:510–516
14. Joubert A, Zimmerman KM, Bencokova Z, Gastaldo J, Rénier W, Chavaudra N, Favaudon V, Arlett C, Foray N: DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response: at least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity? Int J Radiat Biol 2008, 84:1–19
15. Arlett CF: Presymptomatic diagnosis of Huntington's disease? Lancet 1980, 1:540
16. Arlett CF, Priestley A: Deficient recovery from potentially lethal damage in some gamma-irradiated human fibroblast cell strains. Br J Cancer Suppl 1984, 6:227–232
17. Arlett CF, Muriel WJ: Radiosensitivity in Huntington's disease. Heredity 1979, 42:276
18. Moshell AN, Tarone RE, Barrett SF, Robbins JH: Radiosensitivity in Huntington's disease: implications for pathogenesis and presymptomatic diagnosis. Lancet 1980, 1:9–11

UNCORRECTED PROOF

19. McGovern D, Webb T: Sensitivity to ionising radiation of lymphocytes from Huntington's chorea patients compared to controls. J Med Genet 1982, 19:168−174
20. Deschavanne PJ, Fertil B: A review of human cell radiosensitivity in vitro. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1996, 34:251−266
21. Jeggo PA, Lobrich M: DNA double-strand breaks: their cellular and clinical impact? Oncogene 2007, 26:7717−7719
22. Gorbunova V, Seluanov A: DNA double strand break repair, aging and the chromatin connection. Mutat Res 2016, [in press] doi:10.1016/j.mrfmmm.2016.02.004
23. Merlo D, Mollinari C, Racaniello M, Garaci E, Cardinale A: DNA double strand breaks: a common theme in neurodegenerative diseases. Curr Alzheimer Res 2016, [in press] doi:10.2174/1567205013666160401114915
24. Lobrich M, Jeggo PA: The two edges of the ATM sword: co-operation between repair and checkpoint functions. Radiother Oncol 2005, 76:112−118
25. 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, 100:5057−5062
26. Jeggo PA: Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. Radiat Res 1998, 150:S80−S91
27. Granzotto A, Benadjaoud MA, Vogin G, Devic C, Ferlazzo ML, Bodgi L, et al: Influence of nucleoshuttling of the ATM protein in the healthy tissues response to radiation therapy: toward a molecular classification of human radiosensitivity. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2016, 94:450−460
28. Bodgi L, Foray N: The nucleo-shuttling of the ATM protein as a basis for a novel theory of radiation response: resolution of the linear-quadratic model. Int J Radiat Biol 2016, 92:117−131
29. 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
30. 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
31. Alexander A, Cai SL, Kim J, Nanez A, Sahin M, MacLean KH, Inoki K, Guan KL, Shen J, Person MD, Kusewitt D, Mills GB, Kastan MB, Walker CL: ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. Proc Natl Acad Sci U S A 2010, 107:4153−4158
32. Barlow C, Ribaut-Barassin C, Zwingman TA, Pope AJ, Brown KD, Owens JW, Larson D, Harrington EA, Haeberle AM, Mariani J, Eckhaus M, Herrup K, Bailly Y, Wynshaw-Boris A: ATM is a cytoplasmic protein in mouse brain required to prevent lysosomal accumulation. Proc Natl Acad Sci U S A 2000, 97:871−876
33. Almeida A, Kokalj-Vokac N, Lefrancois D, Viegas-Pequignot E, Jeanpierre M, Dutrillaux B, Malfoy B: Hypomethylation of classical satellite DNA and chromosome instability in lymphoblastoid cell lines. Hum Genet 1993, 91:538−546

UNCORRECTED PROOF

Chapitre d'ouvrage paru dans Huntington's disease, prévalence, pathogenesis and treatment

Chapter

The Huntington's disease protein participates to the nucleo-shuttling of the ATM kinase

Mélanie L. Ferlazzo and Nicolas Foray*

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unit 1052, Radiobiology Group, Cancer Research Centre of Lyon, Lyon, France

ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is a neurodegenerative syndrome caused by mutations of the IT15 gene encoding for the huntingtin (Htt) protein. HD is also associated with cellular radiosensitivity and DNA double-strand breaks (DSB) repair deficiency as reported in our previous study (Ferlazzo et al. Mol Neurobiol. 2014, 49:1200-11). In fact, the HD cells show a delay in the radiation-induced nucleoshuttling of the phosphorylated forms of the ATM kinase that is essential for the recognition and the repair of DSB. Our results suggest that HD belongs to the group of genetic diseases associated with low but significant defect of DSB recognition and repair defect associated with radiosensitivity but also with neurodegeneration.

Keywords: Huntington disease, DSB repair, ATM, ionizing radiation

* Dr. Nicolas Foray, Inserm, UMR 1052, *Groupe de Radiobiologie, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon*, Bâtiment Cheney A, 69008 28 Rue Laennec, Lyon, France. Email : Nicolas.foray@inserm.fr

INTRODUCTION

Huntington's disease (HD) belongs to the group of neurodegenerative diseases but also to the group of radiosensitive ones. The study of the causes of this radiosensitivity may bring a novel understanding of HD.

DNA double-strand breaks (DSB) are the key-DNA damage of radiation response.

To date there is increasing evidence that unrepaired DSB are responsible for cell lethality and tissue radiosensitivity, and misrepaired DSB are linked to genomic instability and cancer proneness [1, 2]. Immunofluorescence technique that allows the detection of individual DSB and of proteins relocalization is upsetting the estimation of genotoxic risk, notably that linked to ionizing radiation exposure [3]. Indeed, some DSB repair and signaling proteins were shown to relocalize after genotoxic stress as discrete nuclear foci, which facilitates their quantification. After stress, nuclear foci generally appear and disappear at rates that depend on numerous factors such as dose, post-stress time and individuals [3-12]. Quantification of the radiation-induced nuclear foci is also at the basis of biological dosimetry that may be useful in case of nuclear accident or estimation of the dose after medical exposure response [3, 13-15]. It was notably shown that immunofluorescence with antibodies against the phosphorylated forms of the variant H2AX histone (γH2AX) allows the detection of DSB [3, 13-15]. The γH2AX foci reflect the radiation-induced DSB that are recognized by the major mammalian DSB repair pathway, the non-homologous end-joining (NHEJ). It is noteworthy that, while γH2AX foci were found to be an interesting biomarker of the radiation response, they present a variety of patterns whose biological signification is not fully understood yet [6, 16].

Some other proteins, like some substrates of the ATM protein kinase also show radiation-induced relocalization as nuclear foci [17, 18]. All these phosphorylated substrates participate to the molecular and cellular response to radiation though DNA damage recognition, DNA damage repair, cell cycle arrest and cellular death steps. While a model of the kinetics of appearance/disappearance of nuclear foci would help in understanding the radiosensitivity and the radiation-induced cancer proneness, there are few bio-mathematical studies available [3, 6, 13-15, 19, 20].

Cells from genetic syndromes, first tools to study radiosensitivity.

In 1981, a correlation between clinical responsiveness (quantified *in vivo* by tumor local control) and intrinsic radiosensitivity (assessed *in vitro* by clonogenic assays) was established [21]. In order to make faster the prediction of the clinical response to radiation, considerable efforts were provided to develop molecular assays [22]. However, to collect cells from patients exhibiting various post-radiotherapy tissue reactions raises a number of practical issues. As a first step, radiobiologists naturally focused on human genetic diseases associated with severe radiation responses that share an array of common clinical and biological features like genomic instability, abnormal yields of chromosomal aberrations and immunodeficiency. This is notably the case of ataxia-telangiectasia (*ATM* mutations), Nijmegen Breakage syndrome (*NBS1* mutations), ataxia telangiectasia like-disorder (ATLD) (*MRE11* mutations), Fanconi anemia (*FANC* genes mutations), Bloom's syndrome (*BLM* mutations), Xeroderma Pigmentosum (*XP* genes mutations), Cockayne syndrome (*CS* genes mutations), and mutations of ligase I (*LIG1*) and ligase IV (*LIG4*). Generally, these syndromes do not show the same radiosensitivity range. However, radiosensitivity may differ *inside a given isogenic group* (*e.g.* classical *vs.* variant *ATM* mutations), and, conversely, cells with mutations of *different genes* may display similar cellular radiosensitivity (*e.g. XP* and *CS* mutations; BLM and FANC mutations) [22]. The development of relevant molecular assays predictive of the clinical radio-responsiveness requires therefore a *quantified* relationship between cellular radiosensitivity and molecular endpoints, independently of mutated genes. Interestingly, all the proteins cited above are involved in the DNA double-strand breaks repair and signaling. While there is a plethoric number of investigations about the potential link between cell survival and DSB repair, all the studies focused on one limited isogenic group with a low number of cell lines [22]. Hence, the fact that the similar risk of reactions can be associated to different mutations of different genes was not really considered in literature. Data from known genetic syndromes will permit to include new molecular markers that would be relevant for the radiation response and that complete our decision algorithm.

An enigma of radiobiology solved by the Huntington's disease?

In 2008, our data from 40 untransformed quiescent human fibroblasts representing 8 different pathologies and one of the largest spectra of human radiosensitivity investigated highlighted the interplay between the NHEJ DSB repair process and an MRE11-dependent, recombination-like repair pathways, both dependent on the ATM kinase activity [2]. In fact, a quantified correlation was obtained between cell survival fraction at 2 Gy (SF2) and the residual (unrepaired) DSB remaining at 24 h post-irradiation. Such a correlation illustrated well the importance of the DSB

repair protein and the fate of DNA damage in the response to radiation [2]. From this correlation, we defined 3 groups of radiosensitivity:

- group I: SF2 > 45%, complete DSB repair, radioresistance and low cancer risk;
- group II: 7% < SF2 < 45%, incomplete DSB repair, moderate radiosensitivity and high cancer risk;
- group III: SF2 < 7%, gross DSB repair defect, hyper-radiosensitivity and high cancer risk.

Interestingly, in 1996, Deschavanne and Fertil published an impressive list of human syndromes associated with cellular radiosensitivity [23]. Among them, some syndromes were not caused by mutations of proteins involved in DNA damage: this is notably the case of Huntington's disease (HD) or neurofibromatosis (NF). Since the corresponding proteins (huntingtin and neurofibromin, respectively) are cytoplasmic and remain in cytoplasm even after irradiation, such findings revealed that radiosensitivity may be caused by mutated proteins that are not directly involved in DNA damage repair [24, 25]. This last hypothesis is not in agreement with the paradigm "*radiosensitivity is only caused by DSB repair defect*" Hence, the study of the radiosensitivity of HD cells became a major issue of radiobiology.

HUNTINGTON'S DISEASE IS A DSB REPAIR AND SIGNALING DISEASE

Huntington's disease: evidence of a radiosensitivity syndrome

The polyglutamine (PolyQ) expansion caused by the mutation in the huntingtin protein (HTT) is associated with oxydative stress. The base excision synthesis and the mismatch repair pathways require a normal huntingtin protein to cope with base damage and DNA adducts, respectively. Futhermore, the consequence of impairment of DNA adducts and base damage repair is substancial in various neurodegerative diseases, including HD [26, 27]. However, other types of DNA damage may be involved in HD progression, and more widely, in neurological disorders in general [28, 29]. If defects in DNA adducts and base damage repair are generally associated with chemosensitivity, photosensitivity and sometimes aging, unrepaired DSBs are the key elements of radiosensitivity. Besides, defects in DSB repair are also compatible with aging and neurodegeneration and radiosensitivity is a clinical feature of HD, and it is rarely mentioned [25]. In the 1980s, different research groups showed that cells provided from HD patients are sensitive to ionizing radiation by

using clonogenic survival as an endpoint. It is noteworthy that most of these studies were performed on quiescent cells (Table 1) [24].

Huntington's disease: a delay in the ATM nucleo-shuttling

In 2014, in order to elucidate the molecular causes of the radiosensitivity of HD cells in the G0/G1 phase, we examined the radiation-induced relocalization of the major ATM phosphorylation substrates implied in DNA damage recognition and repair in untransformed HD fibroblast cell lines. The deliberate choice of the human skin fibroblastic model was motivated by the existence of our DSB repair database composed of various fibroblasts that reflect one of the largest spectra of radiosensitivity in the G0/G1 phase [24, 30].

While the localization of huntingtin (HTT) was shown to be mainly expressed in the brain and localized in the cytoplasm [31, 32], a few reports, if any, described the localization of HTT in human quiescent fibroblasts. By using an anti-HTT antibody whose epitope is situated outside the polyQ domain, our data suggested that HTT is expressed in both normal and HD human skin fibroblasts and that the protein remains in the cytoplasm after a 2 or 4 Gy X-ray exposure followed by 0-24h incubation [24] (Figure 1).

We examined thereafter the DSB recognized by the phosphorylation of H2AX (γ-H2AX). In our conditions, the number of spontaneous anti-γ-H2AX foci observed in the radioresistant controls was not significantly different from those assessed in HD fibroblasts. The anti-γ-H2AX immunofluorescence was applied to fibroblasts from HD patients after 2 Gy X-rays followed by 0–24 h of repair time. The number of radiation-induced γ-H2AX foci scored immediately after 2 Gy in the HD fibroblasts was systematically lower than that in radioresistant, suggesting that HTT mutations contribute to decrease the number of DSB that are recognized by the NHEJ pathway. HD fibroblasts also showed a significantly higher amount of persistent γ-H2AX foci 24 h after irradiation than radioresistant controls, suggesting that HTT mutations contribute to decrease the DSB repair rate, as well. The ATM- and LIG4-mutated fibroblasts are the most hyper-radiosensitive cells in humans. A rapid comparison of the kinetics of radiation-induced γ-H2AX foci demonstrates that the delay observed in the DSB repair rate of HD cells is moderate in comparison with that of the ATM- and LIG4-mutated fibroblasts [24] (Figure 1).

Table 1 Major studies about radiosensitivity of HD cells

Cellular models	Conclusions	References
Primary fibroblasts	HD cells more sensitive than controls	[33]
Primary fibroblasts	HD cells no more sensitive than controls	[34]
Primary fibroblasts	HD cells no more sensitive than controls	[35]
Primary fibroblasts	one sensitive and one normal HD cell	[36]
Lymphocytes	HD cells more sensitive than controls	[37]
Lymphoblastoid cells	HD cells more sensitive than controls	[38]

Clonogenic cell survival assays are considered as the "gold standards" of radiobiology to evaluate radiosensitivity [21]. When applied to representative untransformed fibroblasts ($ATM^{-/-}$, $LIG4^{-/-}$, HD, and radioresistant controls), it appears that HD cells show a significant but moderate radiosensitivity. When data are fitted to the linear-quadratic model, the α and β values were found to be $\alpha = 0.4 \pm 0.02\ Gy^{-1}$ and $\beta = 0.04 \pm 0.01\ Gy^{-2}$ for HD cells, which correspond to a moderate radiosensitivity similar to Xeroderma pigmentosum, Cockayne's and Bloom's syndromes [2]. An unrepaired DSB range of 0–10 % corresponds to an SF2 range of 10–80 %, explaining why even a low amount of unrepaired DSB can lead to significant radiosensitivity [2]. Altogether, these data suggest that HD belongs to group of diseases associated with a weak but significant radiosensitivity with a moderate defect in repair of DSB recognized by NHEJ pathway (Figure 1).

Since the number of γ-H2AX foci scored immediately after irradiation was found systematically lower in HD fibroblasts than in radioresistant controls, we evaluated therefore the activity of ATM, the major kinase responsible for the radiation-induced phosphorylation of H2AX histone, using immunofluorescence with antibodies against the autophosphorylation of ATM (pATMser1981) [39]. In HD fibroblasts, the number of pATM foci per cell observed 10 min postirradiation was found significantly lower than in control cells, with a broad intense nuclear staining [24]. Furthermore, the kinetics of the appearance/disappearance of pATM foci were found to be significantly different from that of radioresistant cells, with a maximum reached between 1 and 4 h post-irradiation, instead of 10 min for control cells (Figure 2). Since HTT remains in the cytoplasm even after irradiation, our data cannot be explained by a direct action of HTT on ATM kinase activity in the nucleus. An alternative explanation would be that HTT mutations may lead to the sequestration of ATM forms in

the cytoplasm, delaying therefore the nucleo-shuttling of the ATM kinase and preventing the recognition and the repair of DSB by the NHEJ pathway [24] (Figure 2).

To verify this last assumption, ATM immunoprecipitation was performed on whole protein cell extracts of HD [24]. Mutated HTT appeared to bind to ATM, likely through its polyQ domain. While the ATM protein was found to be present at a similar extent in all the cell lines tested, HTT was found only in the ATM immunoprecipitates provided from HD cells [24]. This last result indicates that:

- ATM spontaneously binds to mutated but not wild-type HTT
- since HTT, whether mutated or not, is essentially expressed in the cytoplasm, the ATM-HTT interaction occurs essentially in the cytoplasm.

The mecanistic model proposed in [24] was also consolidated by the use of statins and biphosphonates that are both known for their capability to increase ATM nucleoshuttling and to decrease radiosensitivity [24, 40]. Applying this treatment to HD cell restored a radiosensibilty similar to the control cells. The complementation of the ATM nucleo-shuttling impairment should lead to an early phosphorylation of H2AX after irradiation and increases DSB detection and repair (Figure 2).

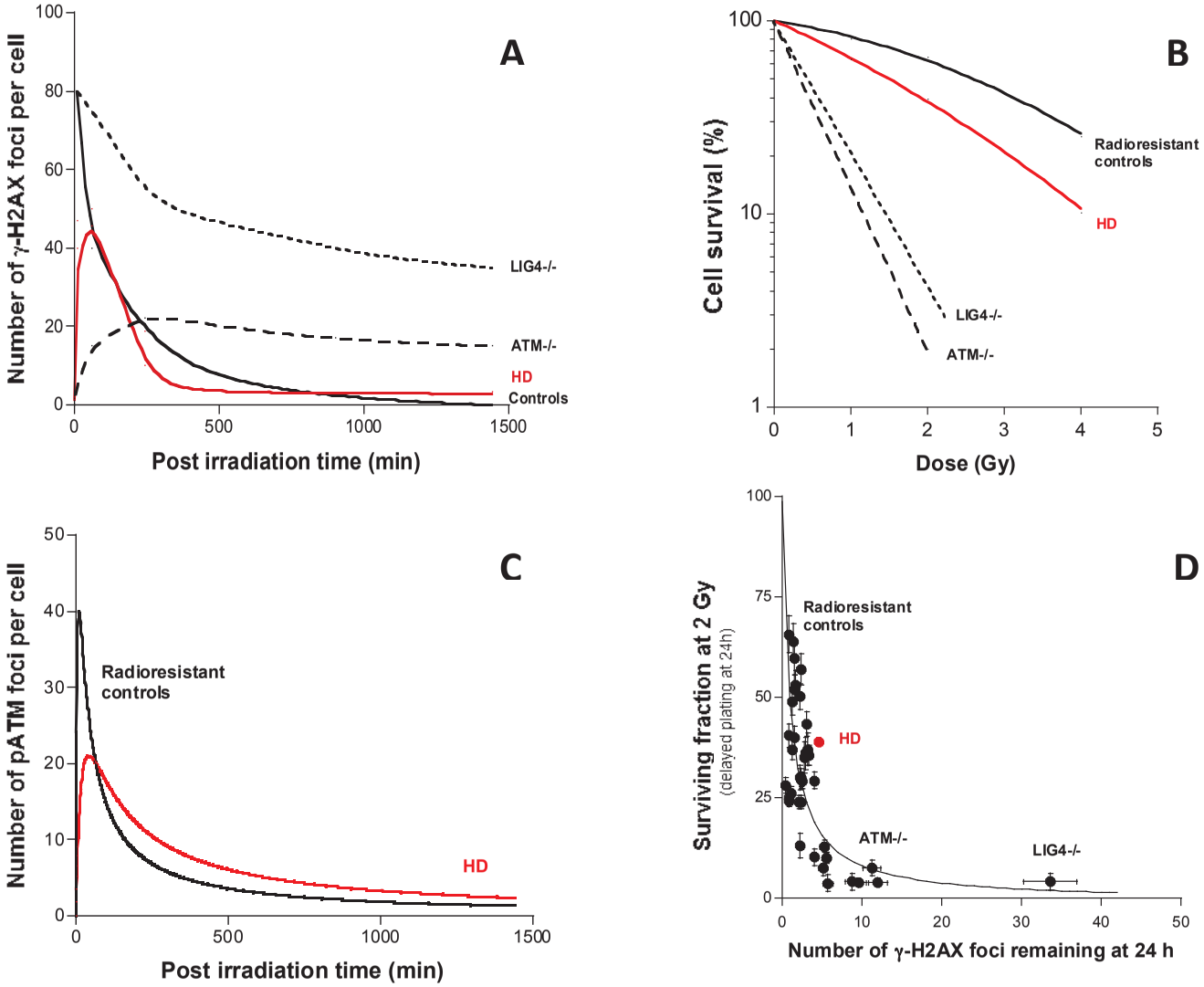


Figure 1 : Major radiobiological data obtained by our research group notably published in [24] on HD, ATM-/-, LIG4-/- and radioresistant fibroblasts. A. Number of γ-HAX foci assessed by immunofluorescence after 2 Gy-irradiation as a function of post-irradiation time. **B.** Cell survival obtained from HD, ATM-/-, LIG4-/- and radioresistant fibroblasts. **C.** Number of pATM foci assessed by immunofluorescence after 2 Gy-irradiation as a function of post-irradiation time. D. Cell survival data at 2 Gy shown in panel B were plotted against the corresponding γ-H2AX data obtained 24 h post-irradiation and shown in panel A.

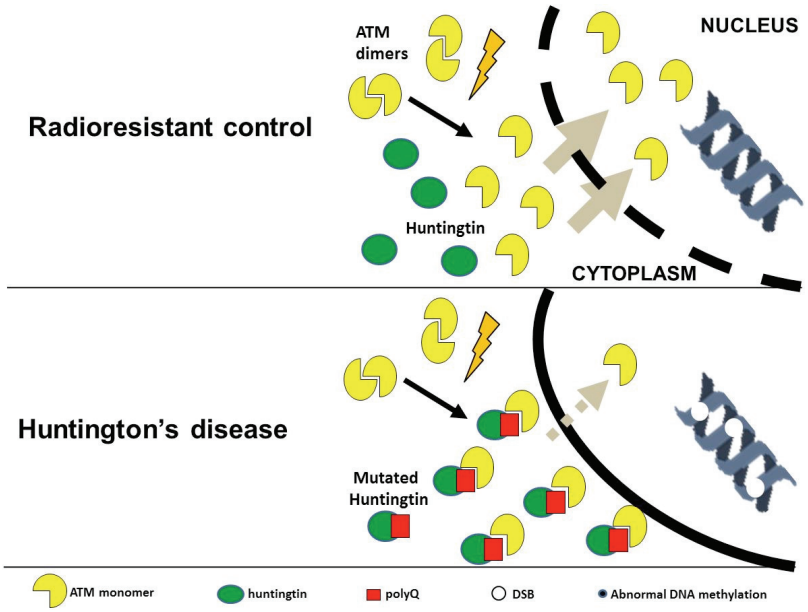


Figure 2: Model of ATM nucleoshuttling. When significant genotoxic stress occurs (e.g. ionizing radiation), it induces monomerization of ATM, which facilitates its diffusion in nucleus. Once in nucleus, DSB are recognized and repaired. In the case of HD cells (lower panel), the mutated HTT protein binds to ATM, which delays the nucleoshuttling of this protein. Consenquently, spontaneous DNA breaks and unrepaired DSB repair are observed.

DISCUSSION

The moderate cellular radiosensitivity of HD is supported by many reports in the literature (Table 1). This radiosensibility is similar to that of syndromes such as Xeroderma pigmentosum, Fanconi anemia, Cockayne's or Bloom's syndromes [23] but also to that of NF and sclerosis tuberous (N. Foray, personal communication). Interestingly, all these syndromes associated with moderate radiosensitivity are also characterized by a low but significant yield of unrepaired DSB. Lastly, all these syndromes are associated with neurodegeneration. What would be the common point between moderate radiosensitivity, DSB repair impairment, delay in the ATM nucleoshuttling and, finally, neurodegeneration?

Recently, by using a collection of 117 fibroblast cell lines providing from patients suffering from post-radiotherapy radiosensitivity reactions, we proposed the following model: 1) ATM protein is mainly cytoplasmic in its dimeric form; 2) Oxidative stress induced by ionizing radiation, triggers the monomerization of ATM dimers, which facilitates its diffusion in nucleus; 3) Once in nucleus, ATM participates to the recognition of DSB via the phosphorylation of H2AX and triggers DSB repair; 4) In the case of radiosensitive cases,

some cytoplasmic proteins can bind to ATM and delay the ATM nucleoshuttling. The slower the ATM nucleoshuttling, the higher radiosensitivity [30, 41]; 5) The rate of ATM nucleoshuttling may also depend on the size and the length of cytoplasm: the longer the cytoplasm, the slower the ATM nucleoshuttling [41]. This last statement may explain the particular radiosensitivity of brain cells like neurons or brain astrocytes. In addition, some reports suggest that ATM is poorly expressed in the nucleus of brain cells [42]. Hence, a constitutive delay of the ATM nucleoshuttling may be particularly exacerbated in brain cells, causing therefore a lack of protection of brain cells against DNA damage. In this case, radiosensitivity and neurodegeneration may be linked.

In the particular case of HD, since HTT, whether mutant or normal, appears only in the cytoplasm, the DSB repair impairments observed in HD fibroblasts cannot be the result of a direct action of HTT in the nucleus. However, our data show abnormal pATM foci kinetics after irradiation, suggesting that a functional HTT in the cytoplasm is required for a normal ATM kinase activity in the nucleus. One of the most relevant models is based on the hypothesis of a nucleo-shuttling of ATM caused that would be prevented by an interaction between ATM and HTT. The ATM immunoprecipitate data support this hypothesis. However, the observation that the only mutated HTT forms interact with ATM suggests that the binding site would be situated in the polyQ HTT domain rather than on the wild-type sequence. Further experiments are needed to determine the precise domains of interaction (Figure 2).

CONCLUSIONS

The radiosensitivity linked to HD is not investigated abundantly in literature. However, the fact that our research group pointed out that the radiation-induced nucleo-shuttling of ATM is correlated to radiosensitivity gives new insights for the understanding of HD. When mutated, the HTT protein may become an ATM substrate through its polyQ domain and prevent its diffusion in nucleus. The phenomenon may be exacerbated in brain cells causing therefore neurodegeneration. Such model may be common to numerous neurodegenerative diseases.

REFERENCES

1. Jeggo PA, Lobrich M. DNA double-strand breaks: their cellular and clinical impact? Oncogene. 2007;26(56):7717-9.
2. Joubert A, Zimmerman KM, Bencokova Z, Gastaldo J, Rénier W, Chavaudra N, et al. DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response: at least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity? International journal of radiation biology. 2008;84(2):1-19.
3. 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(9):5057-62.
4. Maser RS, Monsen KJ, Nelms BE, Petrini JH. hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks. Mol Cell Biol. 1997;17(10):6087-96.
5. Mirzoeva OK, Petrini JH. DNA damage-dependent nuclear dynamics of the Mre11 complex. Mol Cell Biol. 2001;21(1):281-8.
6. Neumaier T, Swenson J, Pham C, Polyzos A, Lo AT, Yang P, et al. Evidence for formation of DNA repair centers and dose-response nonlinearity in human cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2012;109(2):443-8.
7. FitzGerald JE, Grenon M, Lowndes NF. 53BP1: function and mechanisms of focal recruitment. Biochem Soc Trans. 2009;37(Pt 4):897-904.
8. Franchitto A, Pichierri P. Bloom's syndrome protein is required for correct relocalization of RAD50/MRE11/NBS1 complex after replication fork arrest. J Cell Biol. 2002;157(1):19-30.
9. Scully R, Chen J, Ochs RL, Keegan K, Hoekstra M, Feunteun J, et al. Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. Cell. 1997;90(3):425-35.
10. Stewart GS, Wang B, Bignell CR, Taylor AM, Elledge SJ. MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. Nature. 2003;421(6926):961-6.
11. Bekker-Jensen S, Lukas C, Kitagawa R, Melander F, Kastan MB, Bartek J, et al. Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. J Cell Biol. 2006;173(2):195-206.
12. Bekker-Jensen S, Mailand N. Assembly and function of DNA double-strand break repair foci in mammalian cells. DNA repair. 2010;9(12):1219-28.
13. Testard I, Sabatier L. Biological dosimetry for astronauts: a real challenge. Mutat Res. 1999;430(2):315-26.
14. Jakob B, Durante M. Radiation dose detection by imaging response in biological targets. Radiation research. 2012;177(4):524-32.
15. Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. Nucleic acids research. 2008;36(17):5678-94.
16. Costes SV, Chiolo I, Pluth JM, Barcellos-Hoff MH, Jakob B. Spatiotemporal characterization of ionizing radiation induced DNA damage foci and their relation to chromatin organization. Mutat Res. 2010;704(1-3):78-87.
17. Foray N, Marot D, Gabriel A, Randrianarison V, Carr AM, Perricaudet M, et al. A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. The EMBO journal. 2003;22(11):2860-71.
18. Bodgi L, Granzotto A, Devic C, Vogin G, Lesne A, Bottollier-Depois JF, et al. A single formula to describe radiation-induced protein relocalization: towards a mathematical definition of individual radiosensitivity. Journal of theoretical biology. 2013;333:135-45.

19. Lisby M, Barlow JH, Burgess RC, Rothstein R. Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. Cell. 2004;118(6):699-713.
20. Lisby M, Rothstein R. Choreography of recombination proteins during the DNA damage response. DNA repair. 2009;8(9):1068-76.
21. 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.
22. Joubert A, Foray N. Repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in human cells: History, Progress and Controversies. In: Landseer BR, editor. In: New Research on DNA Repair: Nova Science Publishers, Inc; 2006.
23. Deschavanne PJ, Fertil B. A review of human cell radiosensitivity in vitro. International journal of radiation oncology, biology, physics. 1996;34(1):251-66.
24. 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. Molecular neurobiology. 2014;49:1200-11.
25. Ferlazzo ML, Foray N. Huntington's disease: a disease of DNA methylation or of DNA breaks? American Journal of Pathology. 2016;in press.
26. Jonson I, Ougland R, Larsen E. DNA repair mechanisms in Huntington's disease. Molecular neurobiology. 2013;47:1093-102.
27. Enokido Y, Tamura T, Ito H, Arumughan A, Komuro A, Shiwaku H, et al. Mutant huntingtin impairs Ku70-mediated DNA repair. Journal of Cell Biology. 2010;189:425-43.
28. Subba Rao K. Mechanisms of disease: DNA repair defects and neurological disease. Nature clinical practice Neurology. 2007;3(3):162-72.
29. Foray N, Verrelle P. [DNA repair and repair diseases: between molecular models and clinical reality]. Bulletin du cancer. 2011;98(3):257-75.
30. Granzotto A, Benadjaoud MA, Vogin G, Devic C, Ferlazzo ML, Bodgi L, et al. Influence of Nucleoshuttling of the ATM Protein in the Healthy Tissues Response to Radiation Therapy: Toward a Molecular Classification of Human Radiosensitivity. International journal of radiation oncology, biology, physics. 2016;94(3):450-60.
31. Cisbani G, Cicchetti F. An in vitro perspective on the molecular mechanisms underlying mutant huntingtin protein toxicity. Cell Death Dis. 2012;3:e382.
32. Cattaneo E, Zuccato C, Tartari M. Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. Nat Rev Neurosci. 2005;6(12):919-30.
33. Arlett CF, Muriel WJ. Radiosensitivity in Huntington's disease. Heredity. 1979;42:276.
34. Beverstock GC, Simons JW. Study on the variation in X-ray senstivity of human diploid fibroblast. Normal radiosensitivity of cells devrived from patients with Huntington's disease. Mutation Research. 1982;96:75-87.
35. Arlett CF, Priestley A. Deficient recovery from potentially lethal damage in some gamma-irradiated human fibroblast cell strains. Br J Cancer Suppl. 1984;6:227-32.
36. 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. Mutat Res. 1987;184(1):29-38.
37. McGovern D, Webb T. Sensitivity to ionising radiation of lymphocytes from Huntington's chorea patients compared to controls. J Med Genet. 1982;19(3):168-74.
38. 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.
39. Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. Nature. 2003;421(6922):499-506.
40. 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.

41. Bodgi L, Foray N. The nucleo-shuttling of the ATM protein as a basis for a novel theory of radiation response: resolution of the linear-quadratic model. International journal of radiation biology. 2016;in press.
42. 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. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000;97(2):871-6.

ARTICLE III

Radiobiological characterization of neurofibromatosis type I: the neurofibromin protein impacts on the ATM-dependent DNA damage repair and signaling pathway

Zuzana Bencokova[1*], Clément Devic[1*], Mélanie Lydia Ferlazzo[1*], Adeline Granzotto[1], Laurène Sonzogni[1], Steven Franck Burlet[1], Muriel Viau[1], Larry Bodgi[1], Jean-Thomas Bachelet[1], Patrick Combemale[2], Jacques Balosso[3] and Nicolas Foray[1,#]

[1]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR1052, Radiobiology Group, Cancer Research Centre of Lyon, 69008, Lyon, France; [2]Centre Léon-Bérard, 69008, Lyon, France; [3]Service de Radiothérapie, CHU de Grenoble, 38042 Grenoble, France.

[*] These three authors have equally contributed to this work

Pages: 38 including

Tables: 1

Figures : 8

Keywords : neurofibromatosis; NF1; DSB repair; H2AX; MRE11

Indexing phrase : DSB repair and signaling in neurofibromatosis type 1

[#]Author for correspondence: Dr. Nicolas Foray

INSERM UMR 1052 - Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon

Groupe de Radiobiologie - Bât Cheney A - 28 Rue Laennec 69008 LYON FRANCE

Abstract

Neurofibromatosis type 1 (NF1) is a syndrome characterized by high occurrence of *benign* and *malignant* brain tumours and is caused by mutations of neurofibromin. While NF1 was shown to be associated with radiosensitivity, few studies have dealt with the molecular and cellular response of NF1 cells to ionising radiation. Here, we examined the ATM-dependent signaling and repair pathways of the DNA double-strand breaks (DSB), the key-damage induced by ionizing radiation, in skin fibroblasts from NF1 patients. Ten minutes after X-rays irradiation, quiescent NF1 cells showed abnormally low rate of recognized DSB managed reflected by a low yield of nuclear foci formed by phosphorylated H2AX histones. Irradiated NF1 cells also presented a delayed nucleo-shuttling of phosphorylated forms of the ATM kinase, potentially due to a specific binding of ATM to mutated neurofibromin in cytoplasm. Lastly, NF1 fibroblasts showed abnormally high MRE11 nuclease activity suggesting genomic instability. A combination of biphosphonates and statins complemented these impairments by facilitating the nucleoshuttling of ATM, increasing the yield of recognized DSB. Our results showed that NF1 belongs to the group of syndromes associated with low but significant defect of DSB signaling and delay in the ATM nucleo-shuttling associated with radiosensitivity

.

Introduction

Neurofibromatosis type 1 (NF1) is an autosomal dominant neurocutaneous disorder that was identified by Friedrich Von Recklinghausen in 1882 [1]. NF1 is one of the most frequent cancer-prone syndrome, with a birth incidence of 1/2500 and a minimal prevalence of 1/5000. NF1 is a familial cancer syndrome associated with the formation of *benign* tumours along peripheral and optic nerves and melanocytes called "café-au-lait" spots and with high incidence of *malignant* tumours such as neurofibrosarcomas, astrocytomas and rhabdomyosarcomas [2,3]. NF1 syndrome is caused by heterozygous mutations of the NF1 gene, located on chromosome 17q11 and that encodes for a 2818 amino acids protein designated as neurofibromin. Neurofibromin is highly conserved during evolution and contains domains sharing homology with GTPase-activating (GAP) proteins [4]. A number of reports support that neurofibromin inhibits the proto-oncogene Ras: impaired neurofibromin would therefore compromise Ras inactivation resulting in abnormal proliferation [4]. However, this model needs to be more documented since the loss of neurofibromin does not necessarily result in a decrease of Ras levels in all the brain tumours [3,5]. Neurofibromin is systematically expressed in normal tissues from NF1 patients. The heterozygous mutations of neurofibromin that cause NF1 do not necessarily lead to lower expression of the protein. Furthermore, there are considerable differences in the expression of the neurofibromin even between members of the same family [6,7].

NF1 is associated to high susceptibility of benign and malignant tumours whose treatment generally requires radiotherapy fractionated in several sessions [8]. Surprisingly, very few authors have investigated the radiobiological features of NF1. Besides, a number of discrepancies exist between the few reports about NF1 (Table 1). Particularly, no difference between cells from NF1 patients and radioresistant controls was generally observed after one single dose by using clonogenic survival assay and cytogenetics [9] while significant

radiosensitivity after chronic gamma-rays irradiation was reported [10]. To elucidate these discrepancies is therefore of importance, notably to evaluate the occurrence of potential side-effects reactions in NF1 patients and estimate the incidence of radiation-induced tumours that are frequently observed in neurofibromatosis [11,12].

Our understanding of the molecular and cellular radiation response has considerably progressed all along these last years. This is notably the case of repair and signaling of DNA double-strand breaks (DSB) that, if unrepaired, can result in cell lethality, or if misrepaired, can cause potential cancer onset [13]. The ATM protein was shown to be a key-actor or radiation response and its mutations confer the most severe radiosensitivity in humans [14-18]. From 40 untransformed human fibroblasts representing 8 different genetic diseases and 100 derived from patients showing post-radiotherapy tissue reactions, the radiation-induced nucleo-shuttling of ATM was shown to be one of the most reliable predictor of radiosensitivity [13,19-21]. A classification of radiosensitivity in three groups was proposed [13]:

- group I: fast ATM nucleo-shuttling; complete DSB repair, radioresistance and low cancer risk;
- group II: delayed ATM nucleo-shuttling; incomplete DSB repair, moderate radiosensitivity and high cancer risk;
- group III: gross DSB repair defect, hyper-radiosensitivity and high cancer risk.

Here, in order to ask whether NF1 belongs also to the group II, we have the rate of the radiation-induced ATM nucleoshuttling and the relocalization of the major ATM substrates implied in DSB repair and signaling pathways examined in NF1 fibroblasts.

Materials and Methods

Cell lines

Untransformed fibroblast cell lines were chosen for their genomic stability and to avoid any confounding effect of immortalization. Cells were routinely cultured as monolayers with Dulbecco's modified Eagle's minimum medium (DMEM) (Gibco-Invitrogen-France, Cergy-Pontoise, France), supplemented with 20% fetal calf serum, penicillin and streptomycin. All the experiments were performed with cells in plateau phase of growth (95 - 99 % in G0/G1) to overcome any cell cycle effects. The major radiobiological features of the radioresistant control 1BR3 and the *ATM*-mutated AT5BI cell lines were published elsewhere [14]. All the other human cell lines were purchased from Coriell Cell Repositories (Camden, NJ, USA). GM07166 are *NBS1*-mutated fibroblasts. GM01633, GM01858 and GM01859 are provided from NF1 patients with unidentified mutations of neurofibromin. GM01858 and GM01859 provided from biopsy in apparently normal skin area and in cafe-au-lait spots from the same NF1 donor, respectively.

Irradiations and treatment to cisplatin

For all the X-rays irradiations, an X-rays clinical irradiator devoted to research was used to perform all the irradiations. The X-rays beam was produced from a tungsten anode, applying a voltage setting of 200 KV, an intensity of 20 mA and using a filtration of 0.1 mm copper filter. The dose-rate was 1.234 $Gy.min^{-1}$ [14]. For fractionated treatment, confluent cells in glass slides were irradiated (2 Gy) and immediately incubated at 37°C for 24 h before the next session. For exposure to UV, a UVC chamber from Fisher-Bioblock Scientific (Illkirch, France was used. For treatment to cisplatin, cells were incubated for 24 h in complete medium containing 30 μM cisplatin (cis-diamminedichloroplatinumII) (CDDP) purchased by Rhône-Poulenc (Montrouge, France).

ZOPRA treatment

A statin (pravastatin) and a biphosphonate (zoledronate) in association (ZOPRA) can inhibit membrane farnesylation of nucleus and could lead to an increased speed of ATM nucleo-shuttling [22]. The ZOPRA treatment was applied as previously published [22,23]. Briefly, cells were incubated with 1 µM pravastatine (Sigma-Aldrich France, Saint-Quentin-Fallavier, France) in PBS for 24 h at 37 °C. Thereafter, 1 µM zoledronate (Sigma-Aldrich, France) in PBS was added into the culture medium and cells were incubated for 12 h at 37°C. The culture medium was renewed immediately before irradiation.

Cell survival

The intrinsic radiosensitivity was quantified by calculating the surviving fraction at 2 Gy (SF2) from standard clonogenic assay by plating cells in plateau phase of growth 24 h after irradiation (delayed plating, dp), as previously described [24].

Immunofluorescence

Immunofluorescence protocol was described elsewhere [25]. Briefly, cells were fixed in paraformaldehyde for 10 min at room temperature and were permeabilized in 0.5% Triton X-100 solution for 5 min at 4°C. Primary and secondary antibody incubations were performed for 40 and 20 min at 37°C, respectively. Two antibodies against NF1 were used at 1:100: the monoclonal anti-mouse anti-*NF1* (#ab8130) from Abcam (Cambridge, UK) and the polyclonal anti-rabbit anti-*NF1* (#sc67) from Santa-Cruz-Biotechnologies (Santa-Cruz, CA, USA). Anti-$\gamma H2AX^{ser139}$ antibody (#05636; Upstate Biotechnology-Euromedex, Mundolsheim, France) was used at 1:800. Anti-$pATM^{ser1981}$ (#2888; Abcam), -$pDNA\text{-}PK^{thr2609}$ (#ab4194; Abcam), -*53BP1* (#ab21083; Abcam), -$pCHK2^{thr68}$ (#ab32055; Abcam), $p\text{-}p53^{ser15}$ (#ab1431; Abcam), -*BRCA1* (#Ab1; Merck Chemicals - Oncogene Research, Nottingham,

UK) and -*MRE11* (#56211; Abcys, Paris, France) were used at 1:100. Incubations with anti-mouse fluorescein (FITC) and rhodamine (TRITC) secondary antibodies were performed at 1:100 at 37°C for 20 min. Slides were mounted in 4',6' Diamidino-2-Phényl-indole (DAPI)-stained Vectashield (Abcys) and examined with Olympus fluorescence microscope. DAPI staining permitted also to indirectly evaluate yield of G_1 cells (nuclei with homogeneous DAPI staining), S cells (nuclei showing numerous γH2AX foci), G_2 cells (nuclei with heterogeneous DAPI staining) and metaphase (visible chromosomes) [13,21].

Cell extracts, immunoblot and immunoprecipitation

Total extracts were obtained from cells with a RIPA buffer (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 8, 10% glycerol, 0.2% Nonidet NP40 (Sigma) supplemented with proteases and phosphatases inhibitors (Sigma) and applied 20 min at 4°C. Aliquots of nuclear extracts were stored at -70°C and protein concentrations were measured by the Biorad Bradford assay (Biorad, Hercules, CA, USA). Immunoprecipitations and immunoblotting procedures are described elsewhere [25]. Briefly, immunoprecipitations were performed with protein A-Sepharose beads (Millipore) and 30 μg precleared extracts. Immunoblottings were performed with cell extracts boiled in loading buffer and separated by standard SDS-PAGE. Liquid transfer system (BioRad, Hercules, CA, USA) was used for transferring proteins to nitrocellulose membranes (Schleicher and Schuell, Dassel, Germany) (45 min, 140 V). Membranes were incubated with primary antibody for 1 h and with secondary antibody for 45 min. Antibody binding was revealed using an ECL kit (Amersham, Buckinghamshire, U.K.). Anti-*HTT* (precited) and anti-*ATM* (Ab-78) purchased from Abcam- France, Paris).

Statistical analysis

The immunofluorescence data were fitted to the so-called Bodgi's formula that describes the kinetics of nuclear foci formed by some protein relocalizing after genotoxic stress [20]. The number of nuclear foci N(t), at a given dose D and a post-irradiation time t is given by :

$$N(t) = ID\left(1 - \frac{1}{1 + b_{rec}t}\right)^{a_{rec}} \left(\frac{1}{1 + b_{rep}(t - t_0)}\right)^{a_{rep}} \qquad (1)$$

in which: I is the induced number of foci per Gy; a_{rec} and b_{rec} are the recognition rate parameters; a_{rep} and b_{rep} are the repair rate parameters; t_0 represents the delay between the recognition and the repair process. Statistical analysis was performed by using Kaleidagraph v4 (Synergy Software, Reading, PA, USA).

Results

The neurofibromin protein is essentially cytoplasmic in human fibroblasts

A few reports, if any, described localization and expression of the neurofibromin protein in human untransformed fibroblasts after irradiation. The radioresistant 1BR3 and three NF1 fibroblast cell lines were subjected to anti-*NF1* immunofluorescence. In our hands, immunofluorescence signals provided by commercial antibodies against the C-terminal domain of neurofibromin were either absent or artifactual (data not shown). We focused therefore on the localization of this protein by antibodies against the N-terminal amino acids 27-41. The radioresistant 1BR3 fibroblasts showed a broad staining in cytoplasm, an intense signal in the Golgi complex and a lower expression in nucleus (Fig. 1A,B). In all the NF1 fibroblasts tested, neurofibromin was also essentially localized in cytoplasm, with a signal in the Golgi complex that was stronger than that observed in radioresistant controls (Fig. 1A). We examined also the localization of neurofibromin in two hyper-radiosensitive fibroblast cell lines bearing mutations of ATM and of its substrate NBS1. Interestingly, the *NBS1*- and *ATM*-mutated cells show diffuse cytoplasmic forms with a nuclear expression of neurofibromin that was lower than the observed radioresistant controls. The signal was particularly impaired in the *NBS1*-mutated cells (Fig. 1B).

The localization and the expression level of neurofibromin did not change significantly after exposure to 5-20 $J.m^{-2}$ UVC, 30 μM cisplatin or to 2 Gy X-rays, whatever the cell lines tested (data not shown). However, after X-rays doses equal to or higher than 15 Gy (i.e. non clinically-relevant radiation doses), the radioresistant 1BR3 fibroblasts showed higher expression of neurofibromin in the nucleus, suggesting a possible nucleo-shuttling phenomenon (Fig. 1B). Lastly, immunoblots showed that cytoplasmic extracts of NF1 cells may contain more neurofibromin proteins than wild-type cells and that cytoplasmic expression does not change significantly with irradiation (Fig. 1C). Altogether, these findings

support that: 1) neurofibromin is essentially cytoplasmic; 2) exposure to single clinically-relevant X-rays dose does not impact upon its localization; 3) expression of neurofibromin is rather more abundant in NF1 fibroblasts than in wild-type cells; 3) dysfunctions in ATM and NBS1 activity may possibly disturb expression and localization of neurofibromin.

NF1 fibroblasts show a moderate but significant radiosensitivity associated with persistent DSB

Nuclear ATM forms phosphorylate H2AX variant histones to give γH2AX foci. The γH2AX foci formation is considered as the earliest recognition step of DSB managed by non-homologous end-joining (NHEJ), the major DSB repair pathway in humans [26-29]. In our conditions, the number of spontaneous γH2AX foci observed in the radioresistant 1BR3 controls was not significantly different from that assessed in the three NF1 fibroblast cell lines (0.2 ± 0.5 vs. 0.5 ± 0.4 γH2AX foci per cell on average, respectively; $p<0.04$). The anti-γH2AX immunofluorescence was applied to fibroblasts from NF1 patients after 2 Gy X-rays followed by 0-24 h repair time (Fig. 2A). In the radioresistant 1BR3 controls, the number of γH2AX foci scored 10 min after 2 Gy was 80 ± 5 per cell, in very good agreement with the value 37 ± 4 per Gy per cell published previously [13]. The number of induced γH2AX foci scored immediately after 2 Gy in the NF1 fibroblasts was systematically lower than that in 1BR3 cells (70 ± 5 γH2AX foci per cell on average, respectively; $p<0.06$). NF1 fibroblasts showed significantly more persistent γH2AX foci after 24 h post-irradiation (GM01633: 6.1 ± 2.1; GM01858: 8.4 ± 1.43, GM01859: 4.8 ± 1.2 γH2AX foci per cell) than the radioresistant 1BR3 controls (0.8 ± 0.4 γH2AX foci per cell), suggesting a slower DSB repair rate in NF1 cells ($p<0.01$) (Fig. 2A,B). The number of γH2AX foci remaining at 24 h after 2 Gy observed in NF1 cells was found lower than that of the hyper-radiosensitive *ATM*-mutated AT5BI and

LIG4-mutated 180BR fibroblasts, suggesting that radiosensitivity associated with NF1syndrome is significant but moderate [13] (Fig 2A,B).

Unrepaired DSB that propagate all along the cell cycle may lead to irreversibly damaged chromosomal fragments causing mitotic death with micronuclei formation and/or apoptosis. While NF1 cells did not show any spontaneous micronuclei or apoptotic body (data not shown), the percentage of cells with micronuclei was found significantly higher in NF1 fibroblasts than in 1BR3 controls, supporting again a radiosensitive phenotype (Fig. 2C).

The clonogenic surviving fraction at 2 Gy (SF2) is one of the most reliable parameters to quantify cellular radiosensitivity [30]. In 2008, we pointed out a quantified correlation between SF2 and unrepaired DSB assessed after 2 Gy followed by 24 h repair from a collection of 40 untransformed human fibroblasts showing a wide range of radiosensitivity [13]. The surviving fraction at 2 Gy was assessed in the NF1 fibroblasts, revealing a moderate but significant radiosensitivity. Interestingly, the SF2 and γH2AX data obtained from NF1 fibroblasts are in agreement with the quantitative correlation obtained from the collection of 40 untransformed human fibroblasts radiosensitivity [13] (Fig. 2D).

NF1 fibroblasts after fractionated radiotherapy treatment

As specified in Introduction, NF1 cells are not necessarily radiosensitive after a single dose while significant clinical radiosensitivity after chronic gamma-rays irradiation was reported [10]. In order to answer this question, confluent 1BR3 and NF1 fibroblasts were exposed to successive sessions of 2 Gy spaced by 24 h incubation at 37°C. Cells were fixed 24 h after each session. While 0.8 ± 0.4 residual γH2AX foci per cell were observed in 1BR3 cells after the first session of 2 Gy, 4 ± 3 γH2AX foci per cell were assessed after 4 radiotherapy sessions, suggesting a linearly dose-dependent accumulation of DSB (Fig. 3). In the three NF1 fibroblasts, the number of γH2AX foci increased linearly all along the radiotherapy

sessions but at a significantly higher rate than with 1BR3 fibroblasts: it is noteworthy that the number of γH2AX foci after 4 radiotherapy sessions in NF1 fibroblasts is equivalent to that observed in hyper-radiosensitive cells after one single session (Fig.3). Altogether, these findings suggest that NF1 fibroblasts reach a threshold of tissue toxicity faster than radioresistant cell lines after fractionated X-rays dose.

NF1 fibroblasts show a significant delay of the radiation-induced ATM nucleoshuttling

As described above, the number of induced γH2AX foci scored 10 min after irradiation in NF1 fibroblasts was found systematically lower than that in 1BR3 controls. We evaluated therefore the activity of ATM and DNA-PK, the two major kinases responsible for the radiation-induced phosphorylation of H2AX histone with specific antibodies against the autophosphorylation of both kinases ($pATM^{ser1981}$ and $pDNA\text{-}PK^{thr2609}$, respectively) [13]. In radioresistant fibroblasts, an exposure to 2 Gy generally resulted in the formation of about 40 pATM foci 10 min post-irradiation. This number progressively decreased with repair time and was generally not different from zero at 24 h post-irradiation [21]. In this study, data obtained with the 1BR3 cell line is in agreement with these conclusions (43.8 ± 8 and 2.7 ± 1.4 pATM foci per cell at 10 min and 24 h post-irradiation, respectively). In NF1 fibroblasts, the number of pATM foci per cell observed 10 min post-irradiation was found significantly lower in NF1 fibroblasts (GM01633: 1.5 ± 1.5; GM01858: 25 ± 5; GM01859: 15 ± 6 and 1BR3: 43.8 ± 8; $p<0.01$) (Fig. 4A,B). Furthermore, the kinetics of appearance/disappearance of pATM foci were found deeply different in NF1 fibroblasts with a maximum reached between 1 and 4 h post-irradiation. Such delays suggest that some mutations in neurofibromin may cause abnormal radiation-induced ATM kinase activity (Fig. 4A,B).

We thereafter tested the hypothesis that more abundant neurofibromin in the cytoplasm of NF1 cells may contribute to the delay in the radiation-induced ATM nucleoshuttling. After

immunoprecitipation with *anti-ATM* antibodies of cytoplasmic extracts of control and NF1 cells, immunoblots with anti-neurofibromin revealed that ATM spontaneously binds to neurofibromin in cytoplasm. After irradiation, the ATM-neurofibromin complexes became more frequent and more abundant in NF1 cells than in radioresistant controls (Fig. 4C). Altogether, these results suggest that more abundant neurofibromin proteins observed in NF1 cells may be responsible for the sequestration of ATM in cytoplasm after irradiation.

NF1 fibroblasts show impaired activity of DNA-PK kinase after irradiation

In 1BR3 controls, an exposure to 2 Gy resulted in the formation of nuclear pDNA-PK foci at a similar extent and rate than with γH2AX [13]. In NF1 fibroblasts, the number of induced pDNA-PK foci per cell scored 10 min after irradiation was significantly lower in NF1 fibroblasts than in 1BR3 cells and their disappearance rate was also delayed, as observed with γH2AX data ($p<0.01$) (Fig. 5A). Altogether, these data suggest that abnormal ATM and DNA-PK kinase activities in NF1 cells may contribute to an impaired γH2AX-dependent DSB recognition.

As suggested by some manufacturers, antibodies against phosphorylated DNA-PK forms may recognize also the 53BP1 protein, an ATM substrate, known as an early actor of the radiation response [31]. In order to overcome any potential artefact, irradiated fibroblasts were also subjected to an anti-*53BP1* immunofluorescence (Fig. 5B). Ten minutes after 2 Gy, only 5 53BP1 foci per cell were observed in 1BR3 controls (80 foci were scored with pDNA-PK antibodies). The yield of 53BP1 foci reached in these cells their maximum (that did not exceed 40 foci) at 1 h post-irradiation and decreased progressively at 24 h up to an average yield of 3 foci at a similar rate to that of pDNA-PK in agreement with previous observations [13]. No significant difference was observed between the number of 53BP1 foci in NF1

fibroblasts and that of 1BR3 cells ($p>0.5$). It is however noteworthy that the cytoplasmic expression of 53BP1 was higher in NF1 fibroblasts than in 1BR3 controls (Fig. 5B).

NF1 fibroblasts show abnormal relocalization of BRCA1 and CHK2 proteins after irradiation

ATM kinase was shown to phosphorylate a number of protein substrates involved in the cascade of molecular events after irradiation like BRCA1 or the phosphorylated forms of CHK2 (pCHK2), both involved in the cell cycle control [25]. Since the ATM activity in nucleus may be compromised in NF1 cells, we investigated by immunofluorescence the relocalization of BRCA1 and CHK2 proteins after irradiation. While the radiation-induced relocalization of BRCA1 and pCHK2 is visible as numerous and distinct nuclear foci, these foci are absent in irradiated NF1 cells (Fig. 6A), suggesting that functional neurofibromin is required for the normal ATM-dependent activity of these two proteins.

NF1 fibroblasts show abnormally high MRE11 activity after irradiation

This is notably the case of MRE11 protein, a component of the RAD50-MRE11-NBS1 complex that forms nuclear foci after genotoxic stress [13]. We investigated therefore the occurrence of MRE11 foci in the NF1 fibroblasts. MRE11 foci in the 1BR3 controls appeared from 2 to 8 h after 2 Gy and reached their maximal yield at 4 h (Fig. 6B). Interestingly, the three NF1 fibroblasts showed an earlier occurrence of radiation-induced MRE11 foci (reached at about 2 h post-irradiation) and with a higher number of foci (GM01633: 20 ± 2; GM01858: 22 ± 8; GM01859: 15.5 ± 0.5 *vs* 1BR3: 1.3 ± 0.4, $p<0.01$) (Fig. 6B). Lastly, the numbers of MRE11 foci remaining 24 h post-irradiation were also higher than that of 1BR3 controls (Fig.6B). Altogether, these findings support some mutations of neurofibromin can potentially

cause an abnormally high stimulation of the MRE11-dependent repair pathway that may favour genomic instability [13].

ZOPRA treatment results in the radioprotection of NF1 cells

The ZOPRA treatment was shown to accelerate the ATM nucleoshuttling [22,23]. We therefore investigated the effect of ZOPRA treatment to the previously defined molecular endpoints. With regard to radiation-induced micronuclei assessed 24 h after 2 Gy, 3 ± 1 micronuclei per 100 cells were observed in ZOPRA-treated GM01633 cells (instead of 10 ± 3 in untreated cells, $p<0.001$) (Fig. 7A). In agreement with published data, the ZOPRA treatment did not significantly affect the yield of micronuclei of control cells [22,23]. The ZOPRA treatment did not affect kinetics of γH2AX foci appearance in control cells (data not shown). Conversely, in NF1 cells treated with ZOPRA, the number of γH2AX foci after 24 h was found similar to that of control cells (2.0 ± 1.0 versus 6.1 ± 3.0 γ-H2AX foci for ZOPRA-treated and untreated GM01633 cells, respectively; $p<0.001$) (Fig. 7B). The ZOPRA significantly accelerated the ATM nucleoshuttling in GM01633 cells (34 ± 7 pATM foci after 2 Gy and 10 min versus 16 ± 4 for ZOPRA-treated and untreated GM01633 cells, respectively; $p<0.001$) (Fig. 7C).

Discussion

NF1 fibroblasts show a moderate but significant radiosensitivity associated with DSB repair impairment

The NF1 fibroblasts tested here showed a moderate but significant radiosensitivity associated with a significant yield of unrepaired DSB and a delay in ATM nucleo-shuttling, classified as group II radiosensitivity as defined elsewhere [13,20,21]. The molecular and cellular radiosensitivity observed in NF1 fibroblasts is quantitatively similar to that of cells from Xeroderma Pigmentosum, Cockayne's and Bloom's syndrome, Fanconi anemia and Huntington's disease [13,23]. At this step, we would like to stress the fact that, even a small number of unrepaired DSB is sufficient to explain a lethal event. Cornforth and Bedford in 1987 already showed that one unrepaired chromosome break per cell is responsible for the radiation-induced death of quiescent human fibroblasts [32]. In agreement with their work, we provided quantitative evidence that 2-3 unrepaired DSB per cell are sufficient to kill irradiated human fibroblasts [13]. In the present paper, we observed 4.8-8.4 unrepaired DSB per cell in NF1 fibroblasts and 5-10% cells elicited residual micronuclei after 2 Gy X-rays, which corresponds to a SF2 between 10 and 40%, in good quantitative agreement with previous data and similar radiosensitive cases (Fig. 2D) [13]. Finally, it is noteworthy that the radiosensitivity associated with NF1 is drastically different from that observed in ataxia telangiectasia (homozygous ATM mutations) patients that caused systematically fatal reactions to radiotherapy [21,33].

NF1 patients in radiotherapy

One of the clinical consequences of the moderated but significant radiosensitivity of NF1 is a high risk of tissue reactions predicted to be between grade 2 and 3 in the CTCAE scale as

suggested by our last work [21]. Most of the literature data show no difference between radiosensitivity of NF1 cells and that of radioresistant controls. The radioresistance of NF1 cells appears sometimes so marked that some authors have hypothesized that an enhanced radiotolerance of NF1 is correlated with cancer proneness [34]. However, even if the term *cellular radiosensitivity* is associated with clonogenic survival, there are a number of different experimental protocols for evaluating cell survival. As an example, Mao et al. applied a single X-rays dose immediately after seeding to ten fibroblast cell lines derived from NF1 patients: they concluded that radiosensitivity of NF1 cells varied with the same range as that of radioresistant controls [35]. Conversely, while Hannan et al. reached the same conclusion with acute gamma-irradiation, they observed a clonogenic survival significantly lower in NF1 fibroblasts than controls when chronic gamma-irradiation was applied (7.8 $cGy.min^{-1}$) [10] (Table 1). Here, we have deliberately applied a clonogenic survival protocol consisting in seeding cells 24 h after a single-dose irradiation to better account for potentially lethal damage as suggested by literature [13]. In our previous report, we hypothesized that any irradiated group II cell requires a certain number of fractionated radiotherapy sessions to reach a specific level of unrepaired DSB that may cause significant adverse reactions to treatment. By comparison, the radiosensitivity group III cells (LIG4 and ATM mutations) exhibit extreme radiosensitivity already at the first radiotherapy session [13]. Interestingly, data showed in Fig.6 indicate that several fractions of 2 Gy applied to NF1 cells accumulate persistent DSB in a linear dose-dependent manner, suggesting higher radiosensitivity for fractionated dose and probably to chronic exposures. Again, this is also a common feature of the other syndromes belonging to group II. Interestingly, a recent study concludes that radiotherapy provides survival rates similar to or better than non-NF1 patients [8]. Since the radiotherapy treatments of these patients consisted in about 20 fractions of 2 Gy, such a conclusion is not compatible with a strong radioresistance. Further experiments are needed to

better evaluate the radiation-induced risk for normal tissues of NF1 patients and how the ZOPRA treatment may protect cells.

Neurofibromin is involved in the rate of the radiation-induced ATM nucleo-shuttling

The NF1 fibroblasts tested here showed a significant delay in the radiation-induced ATM nucleo-shuttling. These data may notably suggest that a functional neurofibromin is required for a normal ATM kinase activity. But how may neurofibromin act on the ATM protein? Neurofibromin has long been considered as a cytoplasmic protein although some nuclear forms have been described in some neurons and keratinocytes [36,37]. More recently, a nuclear form of neurofibromin has been reported in G2/M cells [38]. However, it must be stressed that we deliberately chose to use quiescent fibroblasts in our experiments because of their high representativity in humans. Let remain that, to the exception of intestine, and even for children, the great majority of cells are quiescent. Hence, our data suggest that neurofibromin may influence ATM inside cytoplasm in quiescent cells. Interestingly, neurofibromin holds a number of SQ and TQ domains, known to be phosphorylation substrates of the ATM kinase, situated close to a localization site (NLS) motif [39]. The data with ATM immunoprecipitates showed in Fig. 4 suggest that ATM and neurofibromin may interact physically in cytoplasm. Besides, Vandenbroucke et al. (2004) suggested that a protein masking the NLS motif and/or insuring phosphorylation at its vicinity may prevent the shuttling of neurofibromin into the nucleus [40]. ATM may belong to these types of proteins. However, supplementary experiments are needed to further investigate the potential interaction between ATM and neurofibromin. One of the most important finding is that such interaction becomes more frequent after irradiation, notably at 1 h post-irradiation. Such time does not permit ATM or neurofibromin to be more expressed. Conversely, we have shown that ionizing radiation may trigger monomerization of the dimeric forms of ATM that

represent the most current forms of ATM observed in cytoplasm. Hence, we can hypothesize that the abundance of ATM monomers after irradiation may result in the formation of numerous complexes with neurofibromin. The fact that, even mutated, the neurofibromin protein is more abundant in NF1 cells may simply explain the observation that the yields of ATM-neurofibromin complexes are more numerous in irradiated NF1 cells (Fig.4). One of the direct consequences of this process would be the sequestration of ATM monomers in cytoplasm in NF1 cells.

Neurofibromin is required for a normal activity of a number of ATM sustrates

The ATM kinase is a key-protein of the response to ionizing radiation, notably through its phosphorylating activity on a number of substrates involved in DNA damage recognition and repair, cell cycle control and cellular death [14-18]. The most direct consequence of this delay is the lack of recognition of DSB managed by NHEJ pathways through the phosphorylation of H2AX. This conclusion is notably supported by data with ZOPRA treatment since the acceleration of the ATM nucleoshuttling reduces the yield of unrepaired DSB and micronuclei.

With regard to DNA-PK activity, the pDNA-PK and γH2AX data are in quantitative agreement in our hands. Our data support that the ATM-dependent phosphorylation of H2AX and the auto-phosphorylation of DNA-PK are concomitant and that ATM activation is upstream these events, as suggested elsewhere [41-43]. By contrast, while 53BP1 was shown to co-localize with γH2AX [44], our observations are in discrepancy with any one-to-one interaction between H2AX and 53BP1 at early times post-irradiation since only 15 53BP1 foci were observed in 1BR3 10 min after 2 Gy (80 foci per cell were scored with pDNA-PK and γH2AX antibodies). However, the rate of disappearance of 53BP1 foci was found to be similar to that of pDNA-PK and γH2AX in the 4-24 h post-irradiation range. No significant

difference was observed between the number of 53BP1 foci in NF1 fibroblasts and that of 1BR3 cells. These findings suggest therefore that neurofibromin is not required for the ATM-dependent phosphorylation of 53BP1 in response to radiation or the ATM kinase activity level in NF1 fibroblasts is sufficient to insure the formation of radiation-induced 53BP1.

Another consequence of the delay of the ATM nucleoshuttling in NF1 cells is the impaired localization of the BRCA1 and pCHK2 proteins. Since both proteins are involved in the cell cycle control checkpoints, it may suggest that NF1 cells may exhibit abnormal cell cycle control, which may lead to genomic instability. Some preliminary experiments support such lack of control (data not shown) but additional experiments are required to give better precision on the cellular and clinical consequences of such impairments.

NF1 is characterized by high MRE11 nuclease activity linked to cancer proneness and genomic instability

In our mechanistic model, ATM phosphorylated the MRE11 protein in nucleus which inhibits its nuclease activity [20,13]. The NF1 fibroblasts showed impressive yields of MRE11 foci suggesting hyper-activity of the MRE11 nuclease that participates to a recombination-like pathway, alternative to NHEJ [13]. Interestingly, a great majority of syndromes belonging to the group II were also associated with high MRE11 activity with moderate radiosensitivity and high cancer proneness [13]. Besides, a quantitative correlation was pointed out between the number of MRE11 foci, hyper-recombination process evaluated by plasmid assays and cancer proneness [13]. A delay in the ATM nucleoshuttling may therefore prevent the ATM phosphorylation of MRE11 that would inhibit its nuclease activity required for recombination. In NF1 cells, the hyper-activity of MRE11 may be consistent with the significant risk of second nervous system tumours in NF1 patients who were previously irradiated [11].

Neurofibromin as an important actor of a general model of radiation response

Our recent findings suggest that ionizing radiation induce the monomerization of cytoplasmic ATM dimers which facilitates the diffusion of ATM monomers in the nucleus [20,21,45]. One in the nucleus, the ATM monomers trigger 1) the phosphorylation of H2AX protein, which initiates the recognition of DSB managed by NHEJ; 2) the inhibition of the MRE11 nuclease activity (Fig.8). In the case of NF1 cells, the neurofibromin protein may be more abundant in cytoplasm than in controls which would favor the interaction between ATM and neurofibromin in cytoplasm and lead to the delay of the ATM nucleo-shuttling : consequently, the recognition of DSB by NHEJ is less efficient and more DSB are managed by the MRE11-dependent repair pathway. As a result, cells are more radiosensitive and more susceptible to transformation (Fig. 8). Any acceleration of the ATM nucleo-shuttling, as when cells are treated with ZOPRA may render NF1 cells more radioresistant. Altogether, these hypotheses provide one of the first mechanistic models of the action of neurofibromin after irradiation (Fig. 8).

Acknowledgements

We thank Ms. Beaufrère for her technical assistance. This work was supported by the Institut National du Cancer (INCA), (APRAT), the Plan Cancer / AVIESAN grants, the Commissariat General à l'Investissement (Programmes Investissement d'avenir – projet INDIRA), the Association Pour la Recherche sur l'Ataxie-Telangiectasie and the Association Neurofibromatose et Recklinghausen (ANR).

References

1. Von Recklinghausen F (1882) Über die multiplen Fibrome der Haut und ihre Beziehung zu den multiplen Neuromen. A. Hirschwald, Berlin.
2. Ferner RE (2007) Neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2: a twenty first century perspective. Lancet Neurol 6 (4):340-351
3. Zhu Y, Parada LF (2002) The molecular and genetic basis of neurological tumours. Nat Rev Cancer 2 (8):616-626
4. Yohay KH (2006) The genetic and molecular pathogenesis of NF1 and NF2. Semin Pediatr Neurol 13 (1):21-26
5. Dilworth JT, Kraniak JM, Wojtkowiak JW, Gibbs RA, Borch RF, Tainsky MA, Reiners JJ, Jr., Mattingly RR (2006) Molecular targets for emerging anti-tumor therapies for neurofibromatosis type 1. Biochem Pharmacol 72 (11):1485-1492
6. Easton DF, Ponder MA, Huson SM, Ponder BA (1993) An analysis of variation in expression of neurofibromatosis (NF) type 1 (NF1): evidence for modifying genes. American journal of human genetics 53 (2):305-313
7. Sabbagh A, Pasmant E, Laurendeau I, Parfait B, Barbarot S, Guillot B, Combemale P, Ferkal S, Vidaud M, Aubourg P, Vidaud D, Wolkenstein P, members of the NFFN (2009) Unravelling the genetic basis of variable clinical expression in neurofibromatosis 1. Human molecular genetics 18 (15):2768-2778. doi:10.1093/hmg/ddp212
8. Wentworth S, Pinn M, Bourland JD, Deguzman AF, Ekstrand K, Ellis TL, Glazier SS, McMullen KP, Munley M, Stieber VW, Tatter SB, Shaw EG (2008) Clinical Experience With Radiation Therapy in the Management of Neurofibromatosis-Associated Central Nervous System Tumors. Int J Radiat Oncol Biol Phys
9. Troilo P, Strong LC, Little JB, Nichols WW (1992) Spontaneous and induced levels of chromosomal aberration and sister-chromatid exchange in neurofibromatosis: no evidence of chromosomal hypersensitivity. Mutat Res 283 (4):237-242
10. Hannan MA, Smith BP, Sigut D, Sackey K (1990) Radiosensitivity of fibroblasts obtained from a cafe-au-lait spot and normal-appearing skin of a patient with neurofibromatosis (NF-6). Cancer genetics and cytogenetics 47 (2):191-196
11. Sharif S, Ferner R, Birch JM, Gillespie JE, Gattamaneni HR, Baser ME, Evans DG (2006) Second primary tumors in neurofibromatosis 1 patients treated for optic glioma: substantial risks after radiotherapy. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 24 (16):2570-2575. doi:10.1200/JCO.2005.03.8349
12. Kleinerman RA (2009) Radiation-sensitive genetically susceptible pediatric sub-populations. Pediatric radiology 39 Suppl 1:S27-31. doi:10.1007/s00247-008-1015-6
13. Joubert A, Zimmerman KM, Bencokova Z, Gastaldo J, Rénier W, Chavaudra N, Favaudon V, Arlett C, 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? International journal of radiation biology 84 (2):1-19
14. 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 biology 72 (3):271-283
15. Taylor AM, Byrd PJ, McConville CM, Thacker S (1994) Genetic and cellular features of ataxia telangiectasia. International journal of radiation biology 65 (1):65-70
16. Taylor AM, Harnden DG, Arlett CF, Harcourt SA, Lehmann AR, Stevens S, Bridges BA (1975) Ataxia telangiectasia: a human mutation with abnormal radiation sensitivity. Nature 258 (5534):427-429

17. Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, et al. (1995) A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. Science 268 (5218):1749-1753
18. Savitsky K, Sfez S, Tagle DA, Ziv Y, Sartiel A, Collins FS, Shiloh Y, Rotman G (1995) The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. Human molecular genetics 4 (11):2025-2032
19. Bodgi L, Foray N (2016) The nucleo-shuttling of the ATM protein as a basis for a novel theory of radiation response: resolution of the linear-quadratic model. International journal of radiation biology 92:117-131
20. Bodgi L, Granzotto A, Devic C, Vogin G, Lesne A, Bottollier-Depois JF, Victor JM, Maalouf M, Fares G, Foray N (2013) A single formula to describe radiation-induced protein relocalization: towards a mathematical definition of individual radiosensitivity. Journal of theoretical biology 333:135-145
21. Granzotto A, Benadjaoud MA, Vogin G, Devic C, Ferlazzo ML, Bodgi L, Pereira S, Sonzogni L, Forcheron F, Viau M, Etaix A, Malek K, Mengue-Bindjeme L, Escoffier C, Rouvet I, Zabot MT, Joubert A, Vincent A, Venezia ND, Bourguignon M, Canat EP, d'Hombres A, Thebaud E, Orbach D, Stoppa-Lyonnet D, Radji A, Dore E, Pointreau Y, Bourgier C, Leblond P, Defachelles AS, Lervat C, Guey S, Feuvret L, Gilsoul F, Berger C, Moncharmont C, de Laroche G, Moreau-Claeys MV, Chavaudra N, Combemale P, Biston MC, Malet C, Martel-Lafay I, Laude C, Hau-Desbat NH, Zioueche A, Tanguy R, Sunyach MP, Racadot S, Pommier P, Claude L, Baleydier F, Fleury B, de Crevoisier R, Simon JM, Verrelle P, Peiffert D, Belkacemi Y, Bourhis J, Lartigau E, Carrie C, De Vathaire F, Eschwege F, Puisieux A, Lagrange JL, Balosso J, Foray N (2016) Influence of Nucleoshuttling of the ATM Protein in the Healthy Tissues Response to Radiation Therapy: Toward a Molecular Classification of Human Radiosensitivity. International journal of radiation oncology, biology, physics 94 (3):450-460. doi:10.1016/j.ijrobp.2015.11.013
22. 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 (2008) Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging. Nature medicine 14 (7):767-772
23. Ferlazzo ML, Sonzogni L, Granzotto A, Bodgi L, Lartin O, Devic C, Vogin G, Pereira S, Foray N (2014) 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 49:1200-1211. doi:10.1007/s12035-013-8591-7
24. Badie C, Iliakis G, Foray N, Alsbeih G, Cedervall B, Chavaudra N, Pantelias G, Arlett C, Malaise EP (1995) 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 144 (1):26-35
25. Foray N, Marot D, Gabriel A, Randrianarison V, Carr AM, Perricaudet M, Ashworth A, Jeggo P (2003) A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. The EMBO journal 22 (11):2860-2871
26. Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ (2001) ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. The Journal of biological chemistry 276 (45):42462-42467
27. Rothkamm K, Lobrich M (2003) Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100 (9):5057-5062

28. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. The Journal of biological chemistry 273 (10):5858-5868
29. Bakkenist CJ, Kastan MB (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. Nature 421 (6922):499-506
30. Fertil B, Malaise EP (1981) Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. International journal of radiation oncology, biology, physics 7 (5):621-629
31. Mochan TA, Venere M, DiTullio RA, Jr., Halazonetis TD (2004) 53BP1, an activator of ATM in response to DNA damage. DNA repair 3 (8-9):945-952
32. Cornforth MN, Bedford JS (1987) A quantitative comparison of potentially lethal damage repair and the rejoining of interphase chromosome breaks in low passage normal human fibroblasts. Radiation research 111 (3):385-405
33. Foray N, Bourguignon M, Hamada N (2016) Individual response to ionizing radiation. Mutation Research Review in press
34. Kopelovich L, Rich RF (1986) Enhanced radiotolerance to ionizing radiation is correlated with increased cancer proneness of cultured fibroblasts from precursor states in neurofibromatosis patients. Cancer Genet Cytogenet 22 (3):203-210
35. Mao R, Krone W, Nothdurft W, Reisacher A, Gall H (1985) Cell-culture studies on neurofibromatosis (von Recklinghausen's disease). III. Experiments on X-ray sensitivity. Arch Dermatol Res 277 (6):439-443
36. Li C, Cheng Y, Gutmann DA, Mangoura D (2001) Differential localization of the neurofibromatosis 1 (NF1) gene product, neurofibromin, with the F-actin or microtubule cytoskeleton during differentiation of telencephalic neurons. Brain Res Dev Brain Res 130 (2):231-248
37. Koivunen J, Yla-Outinen H, Korkiamaki T, Karvonen SL, Poyhonen M, Laato M, Karvonen J, Peltonen S, Peltonen J (2000) New function for NF1 tumor suppressor. J Invest Dermatol 114 (3):473-479
38. Koliou X, Fedonidis C, Kalpachidou T, Mangoura D (2016) Nuclear import mechanism of neurofibromin for localization on the spindle and function in chromosome congression. Journal of neurochemistry 136 (1):78-91. doi:10.1111/jnc.13401
39. Traven A, Heierhorst J (2005) SQ/TQ cluster domains: concentrated ATM/ATR kinase phosphorylation site regions in DNA-damage-response proteins. Bioessays 27 (4):397-407
40. Vandenbroucke I, Van Oostveldt P, Coene E, De Paepe A, Messiaen L (2004) Neurofibromin is actively transported to the nucleus. FEBS Lett 560 (1-3):98-102
41. Shiloh Y, Ziv Y (2013) The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. Nature reviews Molecular cell biology 14 (4):197-210
42. Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Lobrich M, Jeggo PA (2004) ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. Cancer research 64 (7):2390-2396
43. Kuhne C, Tjornhammar ML, Pongor S, Banks L, Simoncsits A (2003) Repair of a minimal DNA double-strand break by NHEJ requires DNA-PKcs and is controlled by the ATM/ATR checkpoint. Nucleic acids research 31 (24):7227-7237
44. Markova E, Hillert L, Malmgren L, Persson BR, Belyaev IY (2005) Microwaves from GSM mobile telephones affect 53BP1 and gamma-H2AX foci in human lymphocytes from hypersensitive and healthy persons. Environ Health Perspect 113 (9):1172-1177
45. Ferlazzo ML, Foray N (2016) Huntington Disease: A Disease of DNA Methylation or DNA Breaks? The American journal of pathology 186 (7):1750-1753. doi:10.1016/j.ajpath.2016.05.001

46. Schwenn MR, Weichselbaum RR, Little JB (1985) Investigation of the cytotoxic effects of DNA damaging agents on neurofibromatosis cells. Mutat Res 142 (1-2):55-58
47. Hafez M, Sharaf L, Abd el-Nabi SM, el-Wehedy G (1985) Evidence of chromosomal instability in neurofibromatosis. Cancer 55 (10):2434-2436
48. Woods WG, McKenzie B, Letourneau MA, Byrne TD (1986) Sensitivity of cultured skin fibroblasts from patients with neurofibromatosis to DNA-damaging agents. Ann N Y Acad Sci 486:336-348
49. Hannan MA, Sackey K, Sigut D (1993) Cellular radiosensitivity of patients with different types of neurofibromatosis. Cancer genetics and cytogenetics 66 (2):120-125
50. Crompton NE, Shi YQ, Emery GC, Wisser L, Blattmann H, Maier A, Li L, Schindler D, Ozsahin H, Ozsahin M (2001) Sources of variation in patient response to radiation treatment. Int J Radiat Oncol Biol Phys 49 (2):547-554

TABLE 1: Previous studies of radiation effects, chromosomal aberrations in NF1 cells

NF1 cell lines used (number)	Results	Genotoxic treatments	Method used	Reference
Skin fibroblasts (5)	No mutagen hypersensitivity	UV, X-rays, alkylating agents	Colony formation	[46]
Blood lymphocytes (6)	Significant chromosomal instability	X-rays	Cytogenetics	[47]
Fibroblast-like cells derived from peripheral neurofibromas (10)	No radiosensitivity	X-rays	Colony formation	[35]
Skin fibroblasts	Enhanced radiotolerance of neurofibroma and "café-au-lait" fibroblasts Normal tolerance of skin fibroblasts	X-rays	Colony formation	[34]
Skin fibroblasts		X-rays, alkylating agents	Colony formation	[48]
Blood lymphocytes (8)	Significant chromosomal instability	X-rays	Cytogenetics	[47]
Fibroblast-like cells derived from peripheral neurofibromas and "café-au-lait" fibroblasts	No radiosensitivity after acute irradiation but increased radiosensitivity after chronic irradiation	X-rays	Colony formation	[10]
Skin fibroblasts Blood lymphocytes Lymphoblastoid lines	Spontaneous and induced chromosomal instability	X-rays, alkylating agents	Cytogenetics	[9]
Skin fibroblasts Fibroblast-like cells derived from peripheral neurofibromas and "café-au-lait" (9)	Increased radiosensitivity after chronic irradiation	X-rays chronic exposure	Colony formation	[49]
Blood leukocytes (8)	No radiosensitivity but compromised apoptotic T-cell response to X-rays	X-rays	Leukocyte apoptosis assay	[50]

Legend to figures

Figure 1: Subcellular localization of neurofibromin. A and B. Anti-neurofibromin immunofluorescence was applied to the indicated fibroblasts treated or not with X-rays at the indicated doses and repair times. White bar indicates 5 μm. C. Immunoblots with anti-neurofibromin of cytoplasmic extracts from the indicated cells (1BR3 for controls and GM1859 for NF1 cells). Tubulin served as loading control for cytoplasmic extracts.

Figure 2: DSB repair and micronuclei in NF1 fibroblasts. A. NF1 and 1BR3 fibroblasts were exposed at 2 Gy X-rays following the indicated times for repair. The number of γH2AX foci was plotted against repair times. Each plot represents the mean ± standard error (SEM) of at least three replicates. **B.** Percentage of γH2AX foci remaining at 24 h. Each plot represents the mean ± SEM of at least three replicates. Lower panel shows representative γH2AX- and DAPI-stained nuclei after the same treatments. White bar indicates 5 μm. **C.** Percentage of cells showing micronuclei after 2 Gy following by 24 h for repair. Each plot represents the mean ± SEM of at least two replicates. **D.** Correlation between the surviving fraction at 2 Gy (SF2) and the corresponding percentage of γH2AX foci remaining from Corresponding survival and DSB data plots of the three NF1 fibroblasts were included (mean ± SEM of at least three replicates). Cellular radiosensitivity (SF2dp) was found to be inversely proportional to the corresponding percentage of γH2AX foci remaining at 24 h post-irradiation ($SF2dp = 100 / (\gamma H2AX_{24\ h} + 1) - 1$; $r = 0.76$; $p<0.03$) (solid line). [13].

Figure 3: Number of γ-H2AX foci after fractionated X-rays doses. NF1 and 1BR3 fibroblasts were exposed to fractions of 2 Gy X-rays following by 24 h for repair. The number of γ-H2AX foci was plotted against repair times from the first irradiation. Each plot represents the mean ±

standard error (SEM) of N=2 replicates. The dotted line indicates the number of γ-H2AX foci observed after 2 Gy following 24 h for repair in the hyper-radiosensitive ATM- and LIG4-mutated fibroblast cell lines [13].

Figure 4: ATM activity in NF1 fibroblasts. A. Anti-*pATM* immunofluorescence was applied to the NF1-mutated fibroblasts after 2 Gy following by the indicated times. Each plot represents the mean ± SEM at least three replicates. B. Representative examples of pATM- and DAPI-stained nuclei after the same treatment and 10 min and 4 h post-irradiation. White bar indicates 5 μm. C. Immunoprecipation of cytoplasmic extracts of cells treated in the indicated conditions with anti-ATM antibodies followed by immunoblots with anti-neurofibromin antibodies.

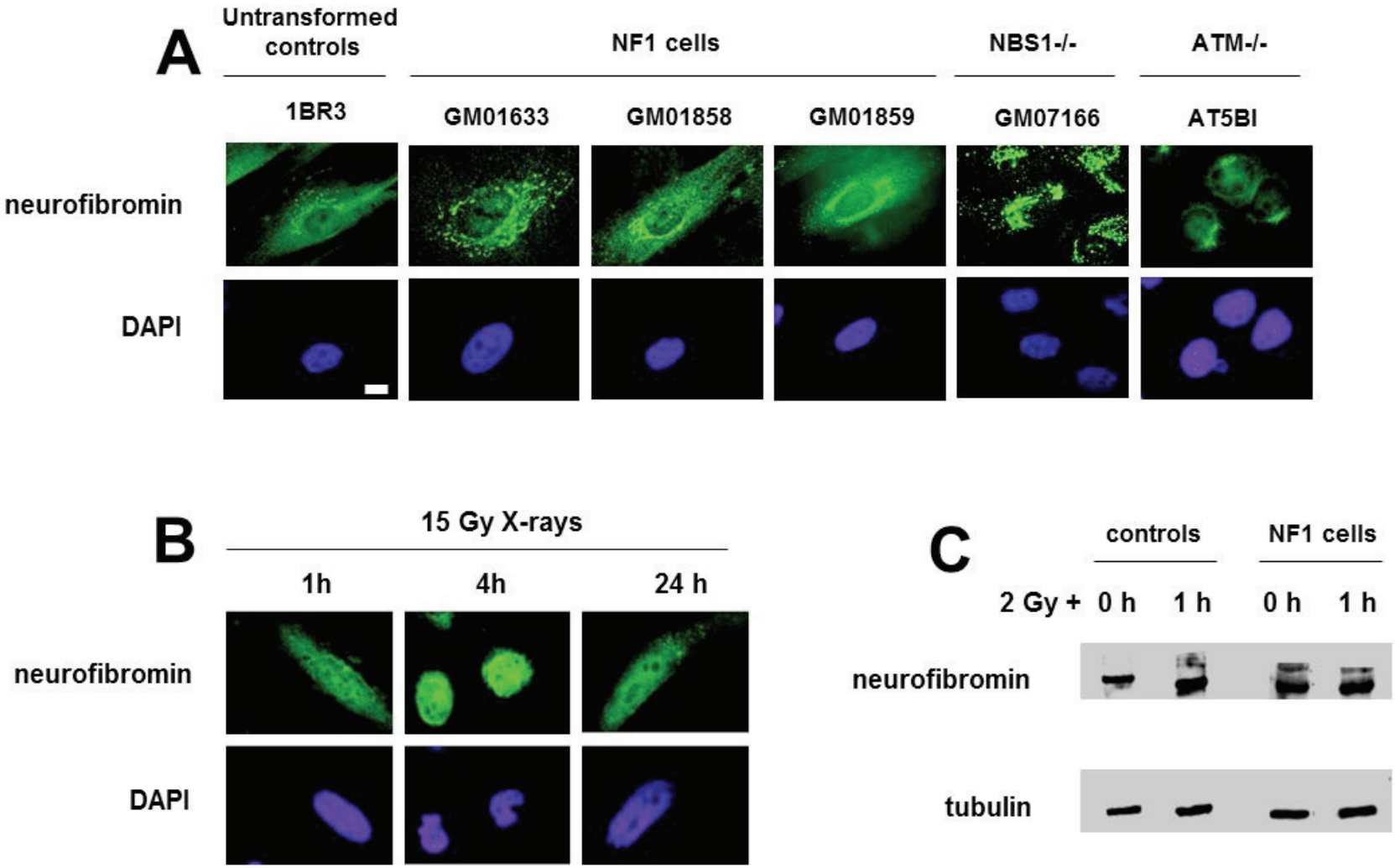
Figure 5: DNA-PK activity and 53BP1 localization in NF1 fibroblasts. A. Anti-*pDNA-PK* immunofluorescence was applied to the NF1 fibroblasts after 2 Gy following by the indicated times. Each plot represents the mean ± SEM of at least three replicates. Lower panel shows representative examples of pDNA-PK- and DAPI-stained nuclei after the same treatment and 24 h post-irradiation. White bar indicates 5 μm. B. Same as panel A but with anti-*53BP1* immunofluorescence Lower panel shows representative examples of 53BP1- and DAPI-stained nuclei after the same treatment and 4 h post-irradiation. White bar indicates 5 μm.

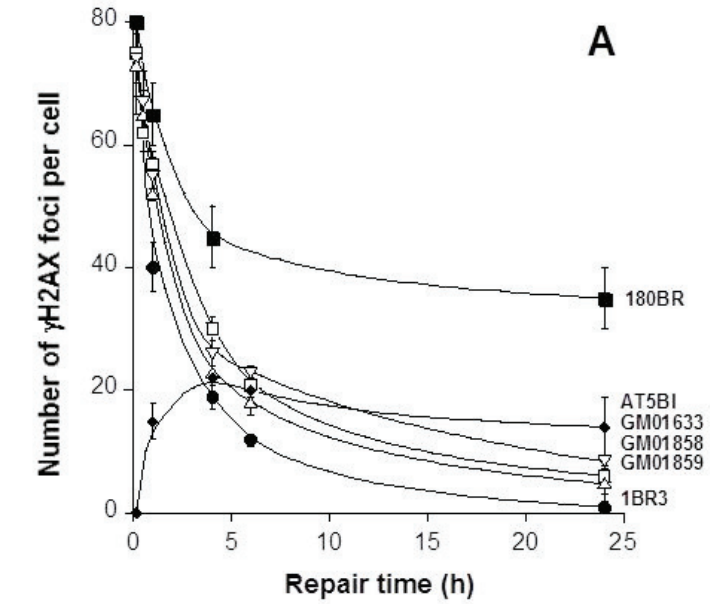
Figure 6: ATM Substrates in NF1 cells. A. Relocalization of BRCA1 and pCHK2 in NF1 fibroblasts. Anti-*BRCA1 and-pCHK2* immunofluorescence was applied to the 1BR3 controls and the NF1 fibroblasts after 2 Gy following by the indicated times. White bar indicates 5 μm. **B. MRE11 activity in NF1 fibroblasts.** Anti-MRE11 immunofluorescence was applied to the NF1 fibroblasts after 2 Gy following by the indicated times. Each plot represents the mean ± SEM of at

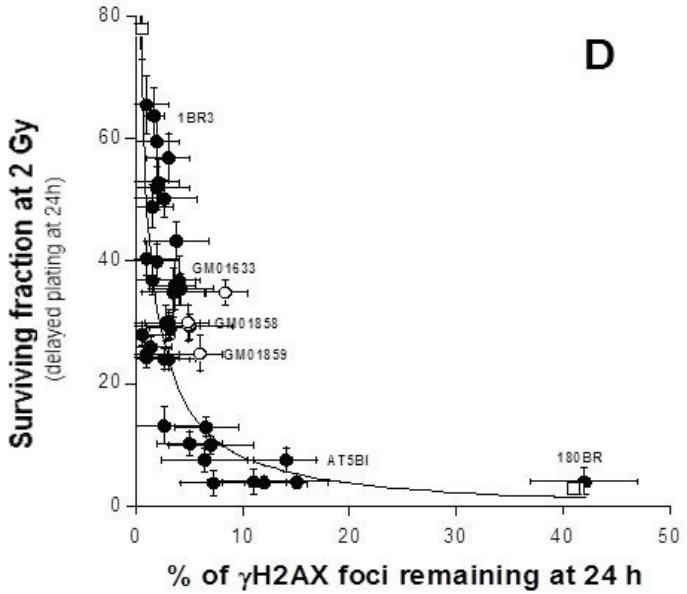
least three replicates. Lower panel shows representative examples of MRE11- and DAPI-stained nuclei after the same treatment and 4 h post-irradiation. White bar indicates 5 μm.

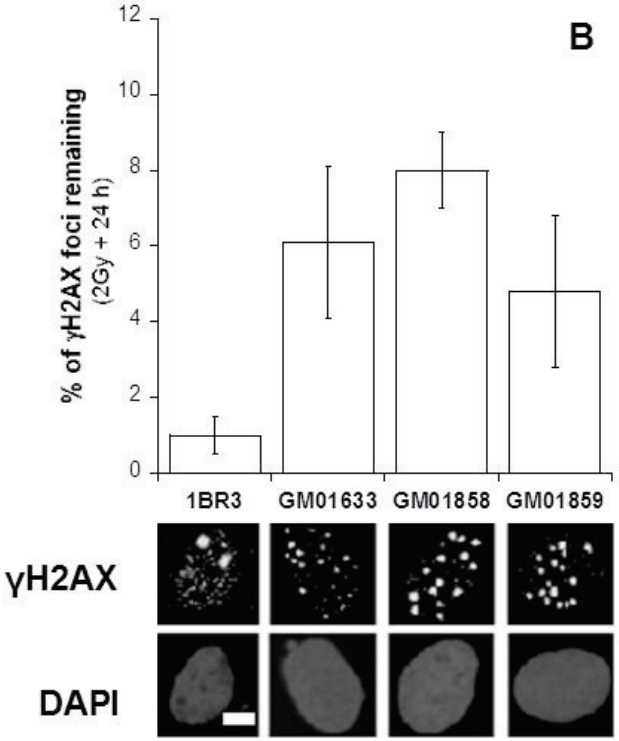
Figure 7: The ZOPRA treatment results in the radioprotection of NF1 cells. The ZOPRA treatment was applied to the radioresistant 1BR3 cells and the GM01633 NF1 cells. The percentage of micronuclei after 2 Gy + 24 h (A), the number of residual γH2AX foci after 2 Gy + 24 h (B) and the number of pATM foci after 2 Gy + 10 min (C) were assessed on untreated and treated cells. Each plot represents the mean ± SEM of at least two replicates.

Figure 8: Mechanistic model of the biological role of neurofibromin protein. In the case of radioresistant controls, irradiation produces the monomerization of ATM that diffuses in nucleus to insure DSB recognition via phosphorylation of H2AX and inhibit MRE11 activity. DSB repair is mainly insured by NHEJ. In the case of NF1 cells, more abundant neurofibromin in cytoplasm may contribute to sequestrate ATM monomers which delays the ATM nucleoshuttling and impairs phosphorylation of H2AX. Consequently, MRE11 activity may contribute to genomic instability and high cancer proneness.


A
Untransformed controls
NF1 cells
NBS1-/-
ATM-/-
1BR3
GM01633
GM01858
GM01859
GM07166
AT5BI
neurofibromin
DAPI
B
15 Gy X-rays
1h
4h
24 h
neurofibromin
DAPI
C
controls
NF1 cells
2 Gy +
0 h
1 h
0 h
1 h
neurofibromin
tubulin


A
Number of γH2AX foci per cell
Repair time (h)
180BR
AT5BI
GM01633
GM01858
GM01859
1BR3


D
Surviving fraction at 2 Gy
(delayed plating at 24h)
% of γH2AX foci remaining at 24 h
1BR3
GM01633
GM01858
GM01859
AT5BI
180BR


B
% of γH2AX foci remaining
(2Gy + 24 h)
1BR3
GM01633
GM01858
GM01859
γH2AX
DAPI

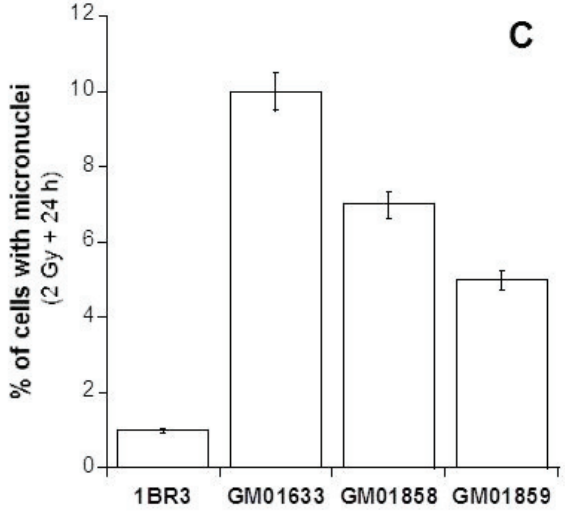

C
% of cells with micronuclei
(2 Gy + 24 h)
1BR3
GM01633
GM01858
GM01859

Figure 2

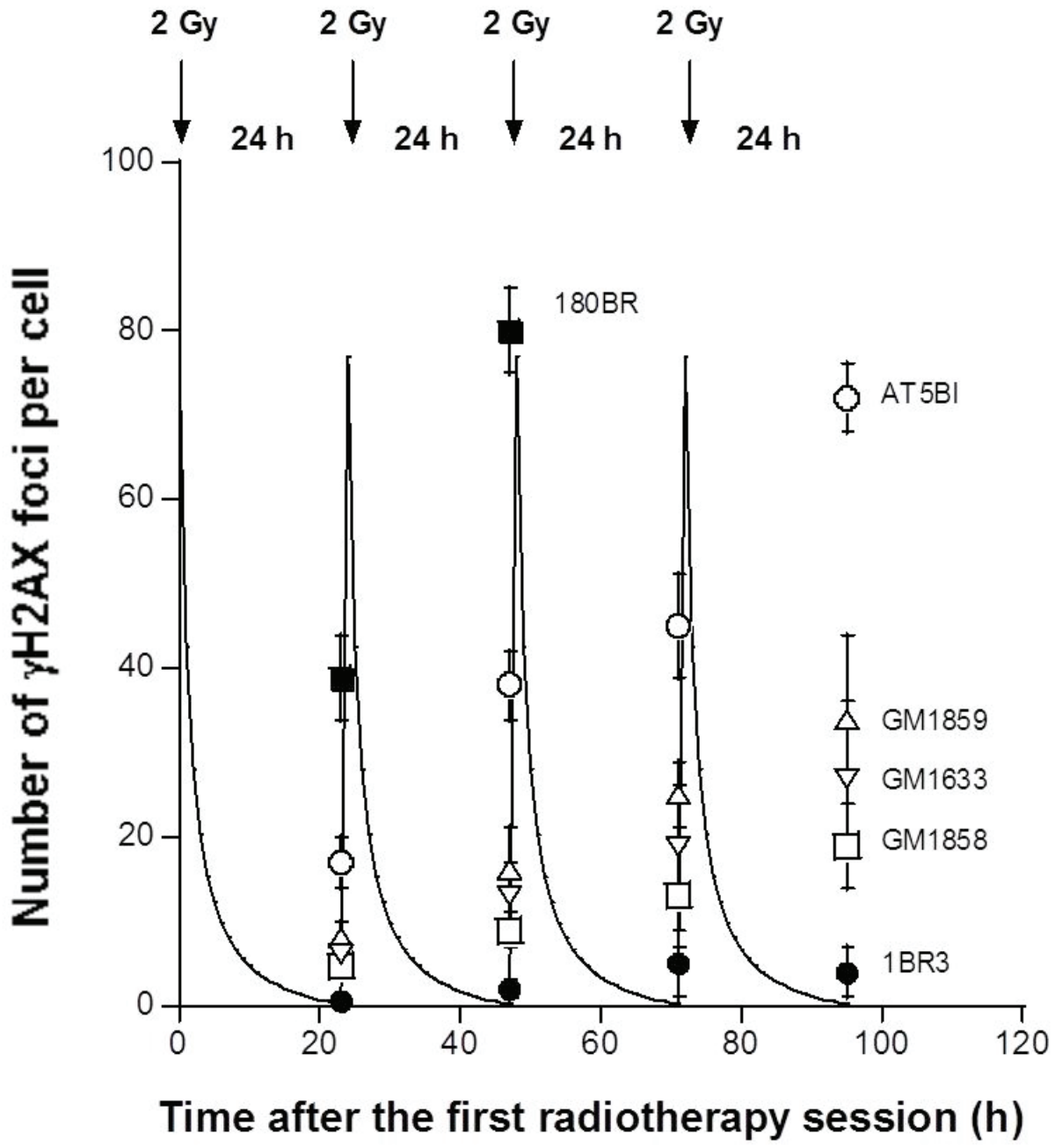

2 Gy
2 Gy
2 Gy
2 Gy
24 h
24 h
24 h
24 h
100
80
60
40
20
0
Number of γH2AX foci per cell
180BR
AT5BI
GM1859
GM1633
GM1858
1BR3
0
20
40
60
80
100
120
Time after the first radiotherapy session (h)

Figure 3

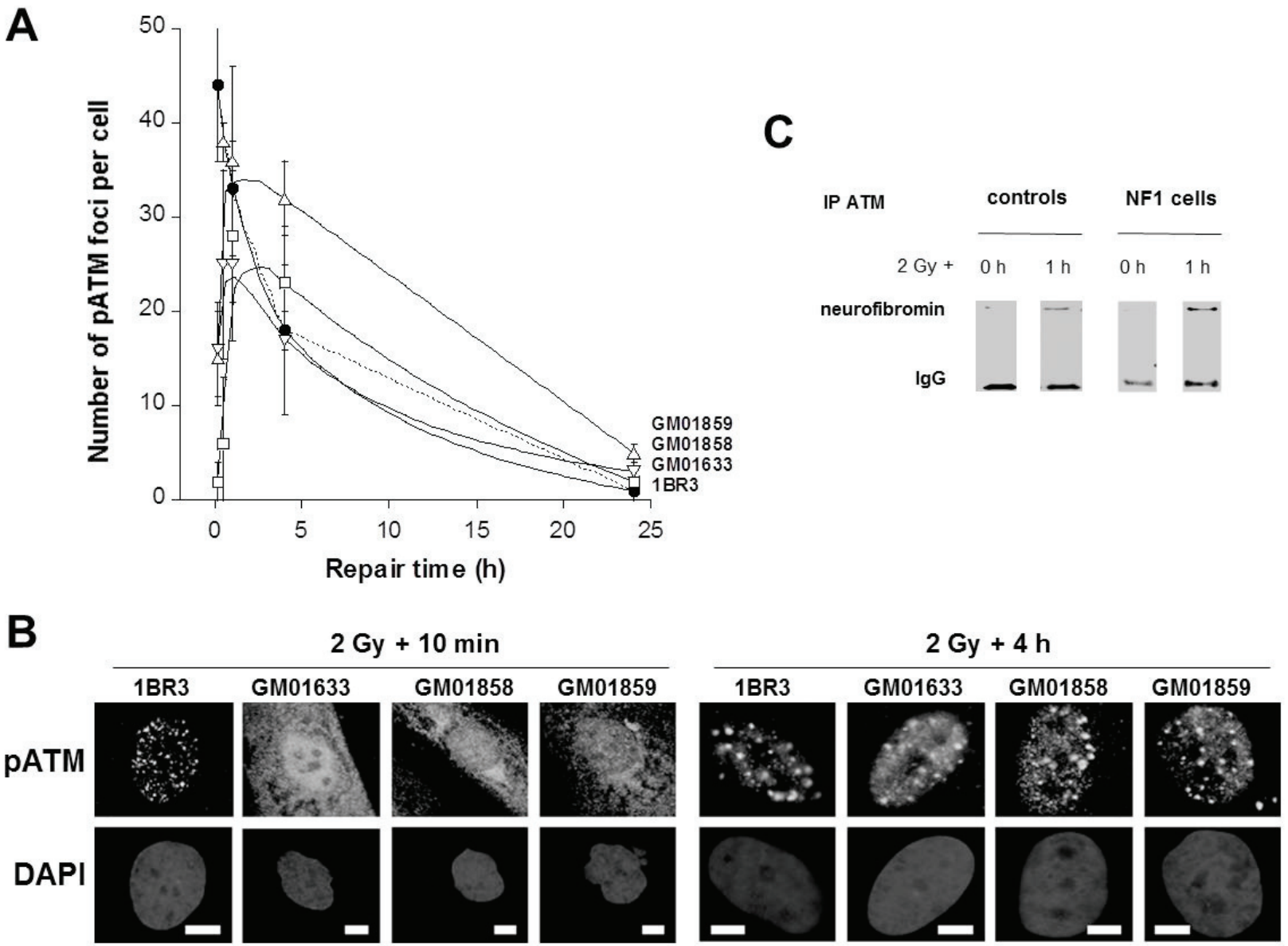

A
Number of pATM foci per cell
Repair time (h)
GM01859
GM01858
GM01633
1BR3
C
IP ATM
controls
NF1 cells
2 Gy +
0 h
1 h
0 h
1 h
neurofibromin
IgG
B
2 Gy + 10 min
2 Gy + 4 h
1BR3
GM01633
GM01858
GM01859
pATM
DAPI

Figure4

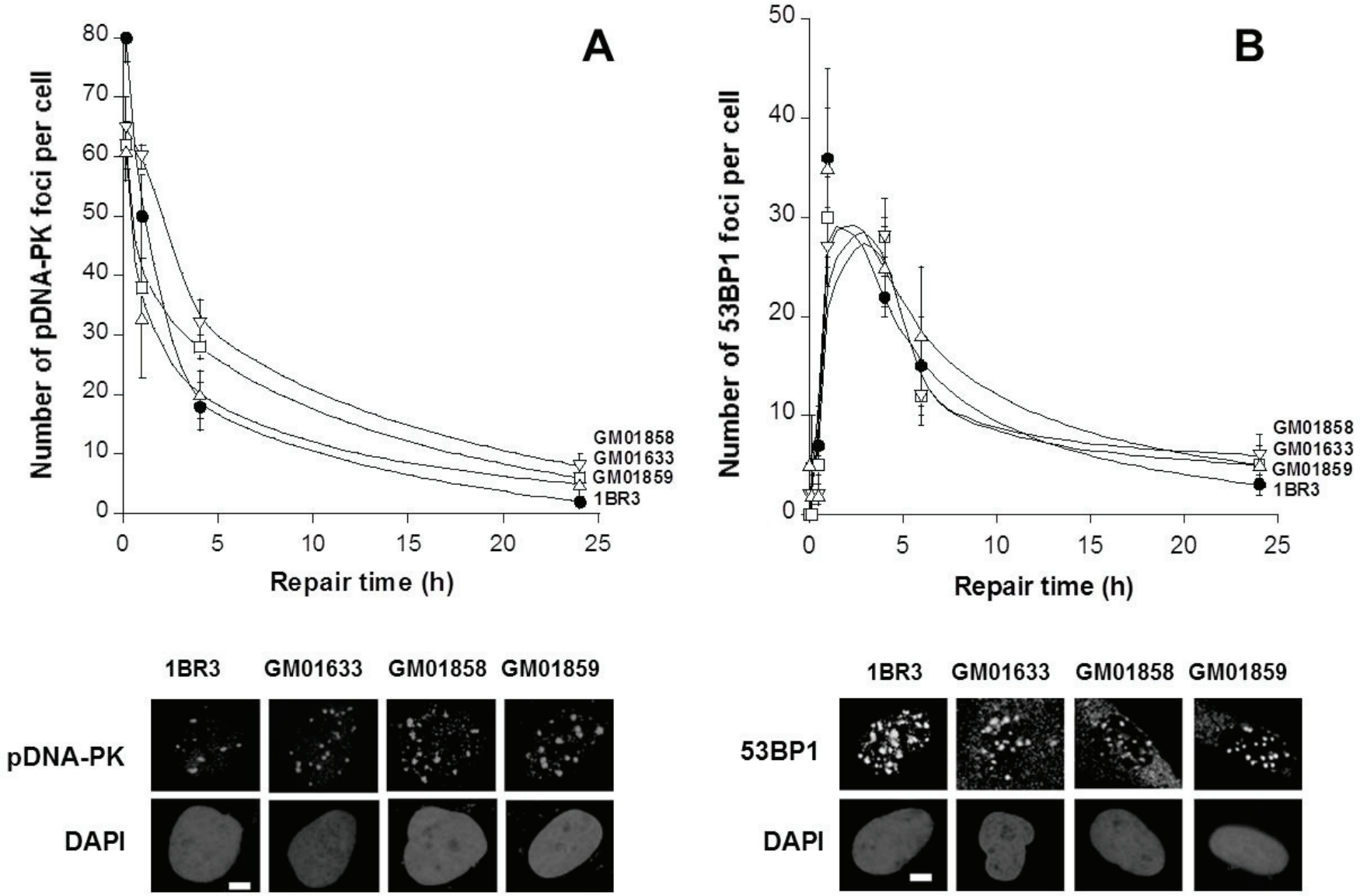

A
Number of pDNA-PK foci per cell
Repair time (h)
GM01858
GM01633
GM01859
1BR3
B
Number of 53BP1 foci per cell
Repair time (h)
GM01858
GM01633
GM01859
1BR3
1BR3
GM01633
GM01858
GM01859
pDNA-PK
DAPI
1BR3
GM01633
GM01858
GM01859
53BP1
DAPI

Figure 5

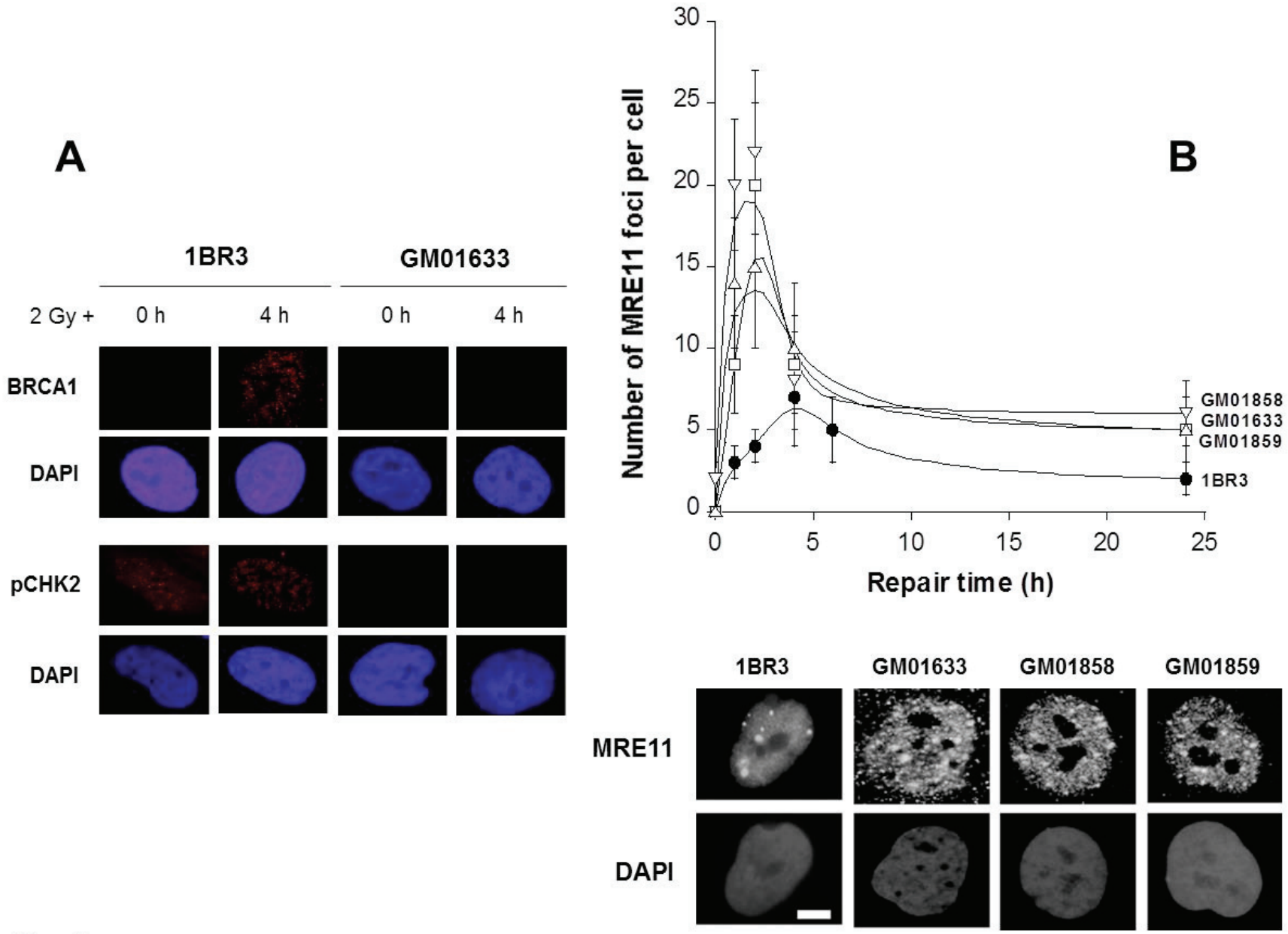

A
1BR3
GM01633
2 Gy +
0 h
4 h
0 h
4 h
BRCA1
DAPI
pCHK2
DAPI
B
Number of MRE11 foci per cell
Repair time (h)
GM01858
GM01633
GM01859
1BR3
1BR3
GM01633
GM01858
GM01859
MRE11
DAPI

Figure 6

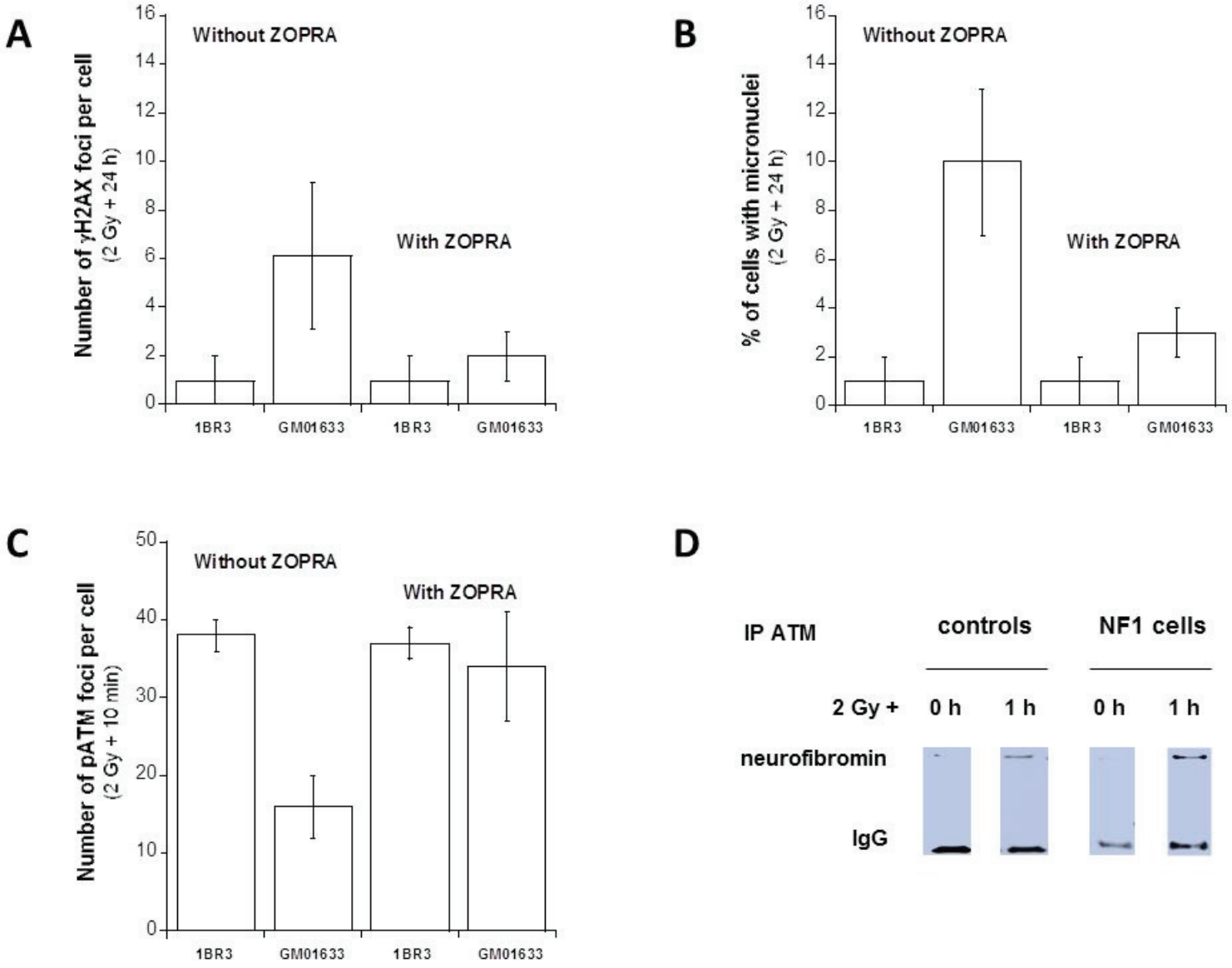
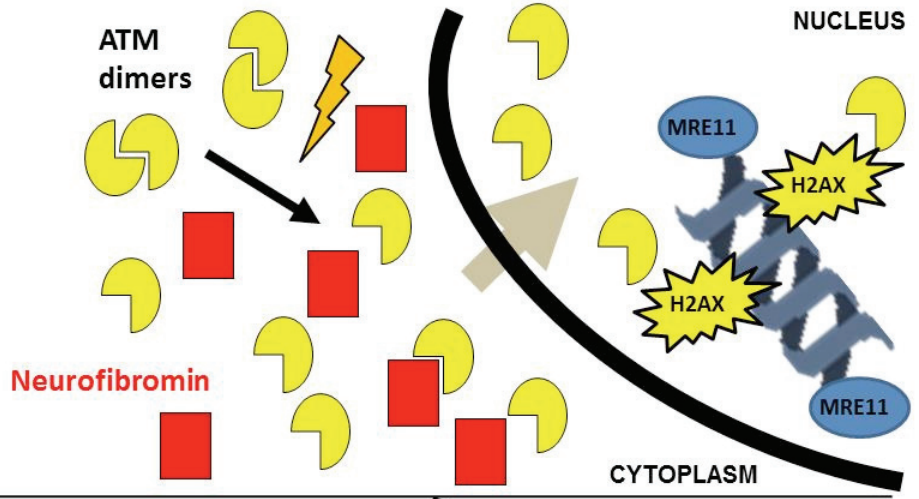

A
Without ZOPRA
With ZOPRA
Number of γH2AX foci per cell
(2 Gy + 24 h)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
1BR3
GM01633
1BR3
GM01633
B
Without ZOPRA
With ZOPRA
% of cells with micronuclei
(2 Gy + 24 h)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
1BR3
GM01633
1BR3
GM01633
C
Without ZOPRA
With ZOPRA
Number of pATM foci per cell
(2 Gy + 10 min)
0
10
20
30
40
50
1BR3
GM01633
1BR3
GM01633
D
IP ATM
controls
NF1 cells
2 Gy +
0 h
1 h
0 h
1 h
neurofibromin
IgG

Figure 7

Radioresistant control
Fast ATM nucleoshuttling
γH2AX phosphorylation
Fast DSB recognition
Complete DSB repair
Radioresistance
Inhibited MRE11 activity
Low risk of cancer



Neurofibromatosis type 1
Delayed ATM nucleoshuttling
Impaired DSB recognition
Impaired DSB repair
Radiosensitivity
High MRE11 activity
High risk of cancer

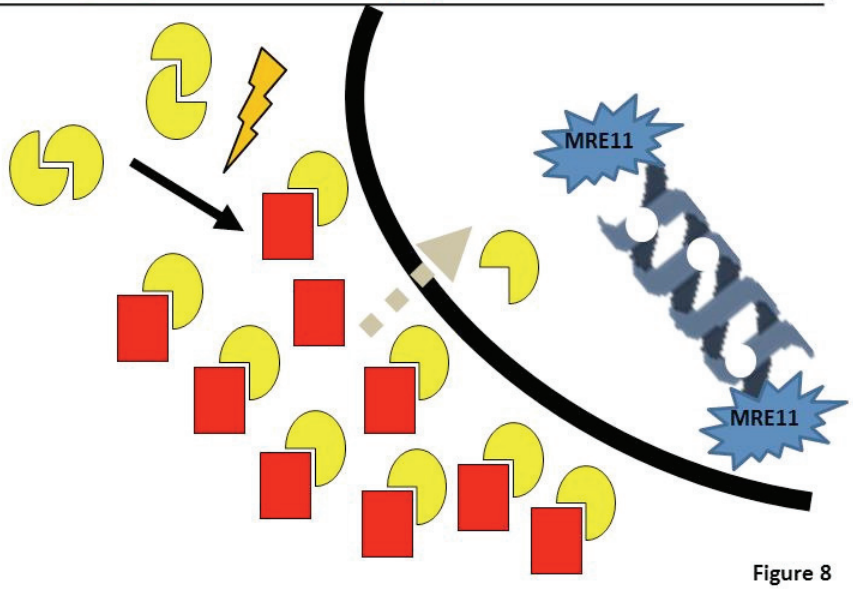


Figure 8

ARTICLE IV

Radiobiological characterization of tuberous sclerosis: A delay in the nucleo-shuttling of ATM may be responsible for radiosensitivity

Mélanie L. Ferlazzo[1], Mohamed Kheir Eddine Bach-Tobdji[2*], Amar Djerad[2*], Laurène Sonzogni[1], Clément Devic[1], Adeline Granzotto[1], Larry Bodgi[1], Jean-Thomas Bachelet[1], Assia Djeffal-Kerrar[2], Christophe Hennequin[3] and Nicolas Foray[1,#]

[1]*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR1052, Radiobiology Group, Cancer Research Centre of Lyon, 69008, Lyon, France;*
[2]*Centre de Recherche Nucléaire d'Alger, 2, Bd Frantz Fanon, Alger, Algérie*
[3]*Hôpital Saint-Louis, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Paris, France.*

*These authors have contributed equally to this work.

Pages: 33 and

Tables: 2

Figures : 8

Keywords :

Indexing phrase :

[#]Author for correspondence: Dr. Nicolas Foray

INSERM UMR 1052 - Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon

Groupe de Radiobiologie - Bât Cheney A - 28 Rue Laennec 69008 LYON FRANCE

Abstract

The tuberous sclerosis complex (TSC) syndrome is associated with numerous cutaneous pathologies (notably on the face), epilepsy, intellectual disability and developmental retardation and, overall, high occurrence of benign tumors in several organs, like angiofibromas, giant cell astrocytomas, renal angiomyolipomas and pulmonary lymphangioleiomyomatosis. TSC is caused by mutations of either of the hamartin or tuberin proteins that are mainly cytoplasmic. Some studies published in the 1980s reported that TSC is associated with radiosensitivity. However, its molecular basis of in TSC cells is not documented enough. Here, we examined the functionality of the repair and signalling of radiation-induced DNA double-strand breaks (DSB) in fibroblasts derived from TSC patients. Quiescent TSC fibroblast cells elicited abnormally low rate of recognized DSB reflected by a low yield of nuclear foci formed by phosphorylated H2AX histones. Irradiated TSC cells also presented a delayed nucleo-shuttling of phosphorylated forms of the ATM kinase, potentially due to a specific binding of ATM to mutated TSC protein in cytoplasm. Lastly, TSC fibroblasts showed abnormally high MRE11 nuclease activity suggesting genomic instability. A combination of biphosphonates and statins complemented these impairments by facilitating the nucleoshuttling of ATM and increasing the yield of recognized DSB. Our results showed that TSC belongs to the group of syndromes associated with low but significant defect of DSB signalling and delay in the ATM nucleo-shuttling associated with radiosensitivity.

Introduction

In 1880, the French neurologist Désirée-Magloire Bourneville described a rare pleiotropic syndrome associated with numerous cutaneous pathologies (notably on the face), epilepsy, intellectual disability and developmental retardation [1]. The major features of this syndrome were benign tumors in several organs, notably in brain, in which Bourneville identified some tubers observable at autopsy [1]. Previously called tuberous sclerosis, this syndrome is now designed as the tuberous sclerosis complex (TSC) syndrome [2,3]. TSC is an autosomal dominant disorder whose prevalence was estimated to be about 2 million individuals worldwide [4,5]. TSC is a cancer proneness syndrome since TSC patients have high incidence of angiofibromas (called adenoma of Pringles, a British dermatologist who worked on TSC), giant cell astrocytomas, renal angiomyolipomas and pulmonary lymphangioleiomyomatosis [4,5].

TSC is caused by heterozygous mutations of either of the two TSC1 and TSC2 genes. TSC1 is located on chromosome 9q34 and encodes for a 1163 amino acids protein of 130 kDa designated as *hamartin [5,6]*. TSC2 is located on chromosome 16p13.3 and encodes for a 1807 amino acids protein of 200 kDa designated as *tuberin* that contains a GTPase activating protein (GAP) domain [5,7]. TSC1 and TSC2 interact to form a very large complex of about 1 MDa made of several monomers. The functions of this TSC protein complex still need to be more documented but it is likely involved in the regulation of control cell growth and the activity of the target of rapamycin (TOR) complex 1 (TORC1) [8-12]. The TSC proteins are mainly expressed in cytoplasm. It is noteworthy that mutations observed in TSC patients do not necessarily result in a lower gene expression [13].

In 2010, the ATM protein, a major stress response factor involved in the DNA double-strand breaks (DSB) repair and radioresistance, was shown to regulate the activity of the TSC2 protein [14]. We have recently provided evidence that the rate of the nucleo-shuttling of ATM

protein was a good predictor of radiosensitivity: irradiation triggers the monomerization of the abundant cytoplasmic ATM dimers, which allows the ATM monomers to diffuse in the nucleus. Once in nucleus, the ATM monomers phosphorylate the variant H2AX histone proteins which triggers the recognition of DNA double-strand breaks (DSB), the key-lesion of radiation response whose complete repair is required for radioresistance [15,16]. In quiescent mammalian cells, the DSB repair is mainly insured by the non-homologous end-joining (NHEJ) pathway whose γH2AX is the first sensor [17]. From hundreds fibroblasts derived from patients suffering from genetic disease or post-radiotherapy radiosensitivity, we have shown that any delay in the nucleoshuttling of ATM may cause lack of DSB recognition, incomplete DSB repair and radiosensitivity [18,19,16]. Particularly, the mutated huntingtin protein that causes the Huntington's disease was shown to interact with ATM in cytoplasm by causing radiosensitivity [20,21]. More recently, neurofibromin protein whose mutations are responsible for neurofibromatosis type I was also shown to delay the radiation-induced nucleoshuttling of ATM (Bencokova et al., submitted).

In their impressive review of human radiosensitivity, Deschavanne and Fertil (1996) evoked TSC as a genetic syndrome associated with a moderate but significant radiosensitivity [22]. This statement was notably established from 3 reports published in the 1980s [23-25] (Table 1). Here, in order to document molecular and cellular radiosensitivity of TSC, we examined the radiation-induced relocalization of the major DSB repair sensors and the rate of ATM nucleo-shuttling in 3 fibroblasts cell lines from TSC patients.

Materials and Methods

Cell lines

Untransformed fibroblast cell lines were used for their genomic stability and to avoid any confounding effect of immortalization. Cells were routinely cultured as monolayers with Dulbecco's modified Eagle's minimum medium (DMEM) (Gibco-Invitrogen-France, Cergy-Pontoise, France), supplemented with 20% fetal calf serum, penicillin and streptomycin. All the experiments were performed with cells in plateau phase of growth (95 - 99 % in G0/G1) to overcome any cell cycle effects. The radiobiological features of the radioresistant control 1BR3 and 161BR and the *ATM*-mutated AT5BI cell lines were published elsewhere [26,27]. The 3 TSC fibroblast cell lines tested here were purchased from Coriell Cell Repositories (Camden, NJ, USA): GM06100 [28] GM06121 [28] and GM01635 [23] are provided from TSC patients. Their clinical and genomic characteristics are detailed in Table 2.

Irradiations

An X-rays clinical irradiator devoted to research was used to perform all the irradiations. The X-rays beam was produced from a tungsten anode, applying a voltage setting of 200 kV, an intensity of 20 mA and using a filtration of 0.1 mm copper filter. The dose-rate was 1.234 $Gy.min^{-1}$ [26].

ZOPRA treatment

A statin (pravastatin) and a biphosphonate (zoledronate) in association (ZOPRA) can inhibit membrane farnesylation of nucleus and could lead to an increased speed of ATM nucleo-shuttling [29]. The ZOPRA treatment was applied as previously published [29,21]. Briefly, cells were incubated with 1 µM pravastatine (Sigma-Aldrich France, Saint-Quentin-Fallavier, France) in PBS for 24 h at 37 °C. Thereafter, 1 µM zoledronate (Sigma-Aldrich, France) in

PBS was added into the culture medium and cells were incubated for 12 h at 37°C. The culture medium was renewed immediately before irradiation.

Cell survival

The intrinsic radiosensitivity was quantified by calculating the surviving fraction at 2 Gy (SF2) from standard clonogenic assay by plating cells in plateau phase of growth 24 h after irradiation (delayed plating, dp), as previously described [30].

Immunofluorescence

Immunofluorescence protocol was described elsewhere [31]. Briefly, cells were fixed in paraformaldehyde for 10 min at room temperature and were permeabilized in 0.5% Triton X-100 solution for 5 min at 4°C. Primary and secondary antibody incubations were performed for 40 and 20 min at 37°C, respectively. Anti-$\gamma H2AX^{ser139}$ antibody (#05636; Upstate Biotechnology-Euromedex, Mundolsheim, France) was used at 1:800. The monoclonal anti-mouse anti-*MRE11* (#56211) from Abcys (Paris, France), the polyclonal anti-rabbit anti-*TSC1* (#ab21632), the monoclonal anti-rabbit anti-*TSC2* (#ab52936), the monoclonal anti-rabbit anti-mTOR (#ab32028), the monoclonal anti-mouse anti-$pATM^{ser1981}$ (#ab2888) from Abcam (Cambridge, UK) were used at 1:100. Incubations with anti-mouse fluorescein (FITC) and rhodamine (TRITC) secondary antibodies were performed at 1:100 at 37°C for 20 min. Slides were mounted in 4',6' Diamidino-2-Phényl-indole (DAPI)-stained Vectashield (Abcys) and examined with Olympus fluorescence microscope. DAPI staining permitted also to indirectly evaluate yield of G_1 cells (nuclei with homogeneous DAPI staining), S cells (nuclei showing numerous γH2AX foci), G_2 cells (nuclei with heterogeneous DAPI staining) and metaphase (visible chromosomes) [18,16].

Cell extracts, immunoblot and immunoprecipitation

Total extracts were obtained from cells with a RIPA buffer (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 8, 10% glycerol, 0.2% Nonidet NP40 (Sigma) supplemented with proteases and phosphatases inhibitors (Sigma) and applied 20 min at 4°C. Aliquots of nuclear extracts were stored at -70°C and protein concentrations were measured by the Biorad Bradford assay (Biorad, Hercules, CA, USA). Immunoprecipitations and immunoblotting procedures are described elsewhere [31]. Immunoprecipitations were performed with protein A-Sepharose beads (Millipore) and 30 μg precleared extracts. Immunoblottings were performed with cell extracts boiled in loading buffer and separated by standard SDS-PAGE. Liquid transfer system (BioRad, Hercules, CA, USA) was used for transferring proteins to nitrocellulose membranes (Schleicher and Schuell, Dassel, Germany) (45 min, 140 V). Membranes were incubated with primary antibody for 1 h and with secondary antibody for 45 min. Antibody binding was revealed using an ECL kit (Amersham, Buckinghamshire, U.K.). Anti-*ATM* (#ab-78) antibodies were purchased from Abcam.

Statistical analysis

The immunofluorescence data were fitted to the so-called Bodgi's formula that describes the kinetics of appearance/disappearance of nuclear foci formed by some protein relocalizing after genotoxic stress [19]. Briefly, the number of nuclear foci N(t), at a given dose D and a post-irradiation time t is given by :

$$N(t) = ID\left(1 - \frac{1}{1 + b_{rec}t}\right)^{a_{rec}}\left(\frac{1}{1 + b_{rep}(t - t_0)}\right)^{a_{rep}}$$

In which: I is the induced number of foci per Gy; a_{rec} and b_{rec} are the recognition rate parameters; a_{rep} and b_{rep} are the repair rate parameters and t_0 represents the delay between the recognition and the repair process. Statistical analysis was performed by using Kaleidagraph v4 (Synergy Software, Reading, PA, USA).

Results

Localization and expression of hamartin and tuberin in different human fibroblasts

A few reports, if any, have described the X-ray-induced localization and expression of the two TSC proteins, hamartin (TSC1) and tuberin (TSC2), in untransformed human fibroblasts. The radioresistant and 3 TSC fibroblast cell lines were therefore subjected to anti-*hamartin* and -*tuberin* immunofluorescence. The radioresistant fibroblasts showed TSC proteins signals essentially localized in cytoplasm (Fig. 1A). The irradiation with 2 Gy X-rays did not change this conclusion, whatever the repair time investigated on the 0-24 h post-irradiation range (data not shown). Similarly, in all the TSC fibroblasts tested, hamartin and tuberin were also essentially localized in cytoplasm (Fig. 1A). Again X-rays did not influence their localization (data not shown). It is however noteworthy that TSC protein staining signal may be even more intense in TSC fibroblasts than in radioresistant controls, supporting that: 1) TSC mutations encountered in TSC patients do not result in a lower expression of the TSC proteins but, to the contrary, to a deregulation of their expression (Fig.1A). The expression of mTOR provided the same conclusions (Fig. 1A). Immunoblots data confirmed notably the predominance of the cytoplasmic forms of tuberin in the TSC fibroblasts (Fig. 1B).

TSC fibroblasts show a moderate but significant radiosensitivity

The surviving fraction at 2 Gy (SF2) was assessed in the GM06100 TSC fibroblasts. The survival data were fitted to the linear-quadratic (LQ) model [15]. The resulting LQ parameters were: $\alpha = 0.7 \pm 0.02$ Gy^{-1} and $\beta = 0.013 \pm 0.01$ Gy^{-2} and the SF2 of 24 ± 2 % supported the diagnosis of a moderate but significant radiosensitivity (Fig. 2A).

Unrepaired DNA breaks that propagate all along the cell cycle may lead to irreversibly damaged chromosomal fragments causing mitotic death with micronuclei formation and/or apoptosis. Yields of radiation-induced micronuclei were the first subcellular parameters

correlated with radiosensitivity [32]. While TSC cells did not show a significant number of spontaneous micronuclei and did not show any apoptotic body (data not shown), the percentage of cells with micronuclei 24 h post-irradiation was found significantly higher in TSC fibroblasts than in 1BR3 radioresistant controls ($p<0.001$), supporting again a radiosensitive phenotype (Fig. 2B).

TSC fibroblasts show an impaired DSB

As evoked above, the nuclear ATM forms phosphorylate H2AX variant histones to give γH2AX foci. The γH2AX foci formation is considered as the earliest recognition step of DSB managed by NHEJ [33,17,34,35]. The number of spontaneous γH2AX foci observed in the radioresistant controls was not significantly different from those assessed in the TSC fibroblasts (0.2 ± 0.5 vs. 0.6 ± 0.4 γH2AX foci per cell on average, respectively). In the radioresistant controls, the number of γH2AX foci scored immediately after 2 Gy was 75 ± 6 per cell, in very good agreement with the value 37 ± 4 per Gy per cell published previously [18]. By contrast, this number in the TSC fibroblasts was significantly lower (41 ± 3 foci per cell on average, respectively; $p<0.001$), suggesting a slower DSB recognition rate via the H2AX phosphorylation (Fig. 3A, B). TSC fibroblasts showed more persistent γH2AX foci after 24 h post-irradiation than controls on average. However, the differences are not significant statistically suggesting ($p>0.05$) (Fig. 3A). The number of γH2AX foci remaining at 24 h after 2 Gy observed in TSC cells was found lower than that of the hyper-radiosensitive ATM-mutated AT4BI fibroblasts [18] (Fig 3A).

In 2008, we pointed out a quantified correlation between SF2 and unrepaired DSB assessed after 2 Gy followed by 24 h repair from a collection of 40 untransformed human fibroblasts showing a wide range of radiosensitivity [18]. Interestingly, the SF2 and γH2AX data obtained from TSC fibroblasts are in total agreement with the quantitative correlation

obtained from the collection of 40 untransformed human fibroblasts radiosensitivity [18] (Fig. 3C).

The radiation-induced ATM nucleo-shuttling is delayed in the TSC cells

Since the number of early nuclear γH2AX foci (resulting from a phosphorylation by ATM) was lower in TSC cells than in radioresistant controls, the nucleo-shuttling of the ATM was examined after irradiation. While an exposure to 2 Gy X-rays resulted in an early formation of nuclear pATM foci in radioresistant controls, the number of pATM after 10 min post-irradiation was found significantly lower in TSC fibroblasts (GM06100: 23 ± 3; GM06121: 25 ± 2; GM01635: 20 ± 2 and 1BR3: 39 ± 3; $p<0.01$) (Fig. 4A). Furthermore, the kinetics of appearance/disappearance of pATM foci were found deeply different in TSC fibroblasts with a maximum reached between 10 min and 1 h post-irradiation. Such findings suggest that some TSC genes mutations may cause delay in the ATM nucleo-shuttling and therefore abnormal nuclear ATM kinase activity in response to radiation.

By examining the nucleo-shuttling of ATM with immunoblots performed with nuclear extracts and with anti-pATM antibodies, we observed significant quantities of pATM molecules in nucleus in radioresistant controls while they were negligible in TSC2 cells, supporting again a delay or an absence of the nucleo-shuttling of ATM in TSC2 cells (Fig 4C). In order to investigate further this specificity, cytoplasmic extracts were immunoprecipitated with anti-ATM antibodies and immunoblots were performed with anti-tuberin: while ATM and tuberin did not interact in radioresistant controls extracts, the ATM-tuberin complex appeared to be stable spontaneously in TSC2 cells and remained significant after irradiation (Fig. 4C).

TSC fibroblasts show abnormally high MRE11 activity after irradiation

ATM kinase was shown to block the MRE11 nuclease activity that is responsible for DSB misrepair and genomic instability via the nuclear relocalization of MRE11 as foci [18]. We investigated therefore the occurrence of MRE11 foci in the TSC fibroblasts. MRE11 foci in the 1BR3 controls appeared from 1 to 4 h after 2 Gy and reached their maximal yield at 4 h (Fig. 5). By contrast, the TSC fibroblasts showed an earlier occurrence of radiation-induced MRE11 foci (reached from 10 min post-irradiation) and with a higher number of foci (Fig. 5). Altogether, these findings support some TSC genes mutations may cause an abnormally high stimulation of the MRE11-dependent repair pathway that favours misrepair and cancer proneness [18].

ZOPRA treatment results in the radioprotection of TSC cells

The combination of a biphosphonate (zoledronate) and an anti-cholesterol statin (pravastatin) (ZOPRA) treatment was shown to accelerate the ATM nucleoshuttling [29,21]. We therefore investigated the effect of ZOPRA treatment to the previously defined molecular endpoints. In agreement with published data, the ZOPRA treatment did not affect kinetics of γH2AX foci appearance/disappearance in control cells [29,21]. Conversely, in TSC2 cells treated with ZOPRA, the number of γH2AX foci was found similar to that of control cells after 10 min (68 ± 7 versus 41 ± 3 γ-H2AX foci for ZOPRA-treated and untreated GM01635 cells, respectively; $p<0.001$) (Fig. 6A) and after 24 h (1 ± 1 versus 3 ± 1 γ-H2AX foci for ZOPRA-treated and untreated GM01635 cells, respectively; $p<0.001$) (Fig. 6B). In addition, the ZOPRA significantly accelerated the ATM nucleoshuttling in GM01635 cells (35 ± 4 pATM foci after 2 Gy and 10 min versus 20 ± 5 for ZOPRA-treated and untreated GM01635 cells, respectively; $p<0.001$) (Fig. 6C).

Discussion

TSC fibroblasts show a moderate but significant radiosensitivity associated with DSB repair impairment

The TSC fibroblasts tested here show a moderate but significant radiosensitivity associated with a significant yield of unrepaired DSB and a delay in ATM nucleo-shuttling. Such findings are in agreement with literature data detailed in Table 2. In previously published reports involving 40 fibroblast cell lines representing 8 different genetic diseases and 100 derived from patients showing post-radiotherapy tissue reactions, the radiation-induced nucleo-shuttling of ATM was shown to be one of the most reliable predictor of radiosensitivity [18,15,19,16]. A classification of radiosensitivity in three groups was proposed:

- group I: fast ATM nucleo-shuttling; complete DSB repair, radioresistance and low cancer risk;
- group II: delayed ATM nucleo-shuttling; incomplete DSB repair, moderate radiosensitivity and high cancer risk;
- group III: gross DSB repair defect, hyper-radiosensitivity and high cancer risk.

From this definition, TSC syndrome undoubtedly belongs to the group II of radiosensitivity. This is also the case of Xeroderma Pigmentosum, Cockayne's and Bloom's syndrome, Fanconi anemia, Huntington's disease and neurofibromatosis type I [18,21]. Hence, the data from the TSC cell lines tested here suggest that TSC patients do not show hyper-radiosensitivity leading to fatal reactions after exposure but may elicit post-radiotherapy tissue reactions of grades 2-4. Hence, a particular care must be taken in the radiotherapy treatment planning for TSC patients. As an example, recently, a 61-year-old TSC patient elicited grade 3 reaction during a chemo-radiotherapy [36]. It must be stressed that this conclusion about the

radiosensitivity of the healthy tissues of TSC patients is not necessarily correlated with that of tumor of TSC patients.

TSC is characterized by high MRE11 nuclease activity linked to cancer proneness

In addition to the cellular radiosensitivity linked to a lack of DSB recognition by NHEJ, the TSC cells showed impressive yields of MRE11 foci suggesting a number of misrepaired DSB. In the case of quiescent cells, such misrepaired DSB are processed via a cancer-prone recombination-like pathway, alternative to NHEJ [18]. The delay in the ATM nucleoshuttling observed in TSC cells is likely to be responsible for MRE11 overactivity. After ZOPRA treatment, the ATM nucleoshuttling was accelerated and the number of MRE11 foci reduced, supporting again the link between ATM nucleoshuttling and genomic stability maintenance. The lack of control of MRE11 activity leads to the hyper-recombination phenomenon, also responsible for a number of DNA single-strand breaks (SSB). Interestingly, Yoshida et al. (1985) reported an abnormally fast repair of SSB in TSC fibroblasts), in very good agreement with this hypothesis [37]. In TSC cells, the overactivity of MRE11 is consistent with high cancer proneness linked to TSC, whether tumors were sporadic or radiation-induced [38].

Discussion about the contribution of mTOR in the radiosensitivity phenotype of TSC

Mutations in the *TSC* tumor suppressor genes occur in the majority of patients suffering from TSC. Such mutations over-activate the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway which may contribute to impair some cellular features like control of homeostasis, proliferation and genome integrity maintenance leading to carcinogenesis. From these observations, the use of rapamycin inhibitors rapidly has emerged to provide innovating therapies for patients suffering from pathologies similar to those of TSC patients [14,39-41].

However, while there is strong evidence that the mTOR pathway is involved in carcinogenesis, its link with cellular radiosensitivity is not so obvious. In fact, our understanding of the molecular and cellular radiation response has considerably progressed all along these last years. This is notably the case of repair and signalling of DNA double-strand breaks (DSB) that, if unrepaired, can result in cell lethality and radiosensitivity [18]. As evoked above, the major DSB repair pathway in mammalian quiescent cells is NHEJ, an ATM-dependent pathway. From 40 untransformed human fibroblasts representing 8 different genetic diseases and 100 derived from patients showing post-radiotherapy tissue reactions, the radiation-induced nucleo-shuttling of ATM was shown to be one of the most reliable predictor of radiosensitivity [18,15,19,16]. Conversely, the impairments of mTOR pathways are not necessarily linked to cellular radiosensitivity (radiation-induced cell lethality) and, overall, not linked to the hyper-radiosensitivity like with ATM mutations. Hence, there is maybe a real confusion in literature between the contribution of mTOR in carcinogenesis and radiation-induced carcinogenesis and its contribution in cellular radiosensitivity. Hence, the post-radiotherapy tissue reactions observed in TSC patients are probably not explained by mTOR impairments but via ATM-dependent pathways.

Towards a general mechanistic model for TSC2

The TSC2 fibroblasts tested here show a significant delay in the radiation-induced ATM nucleo-shuttling. These data may notably suggest that functional TSC proteins are required for a normal ATM kinase activity. TSC proteins are mainly cytoplasmic protein although some nuclear forms have been described [14]. However, it must be stressed that we have deliberately chosen to use quiescent fibroblasts in our experiments because of its high representativity in humans. Let remain that, to the exception of intestine, the great majority of cells are quiescent, even for children [32]. Hence, our data suggest that TSC proteins may

influence ATM only inside cytoplasm. Interestingly, TSC proteins hold a number of SQ and TQ domains, known to be phosphorylation substrates of the ATM kinase.

Our recent findings suggest that ionizing radiation induce the monomerization of cytoplasmic ATM dimers which facilitates the diffusion of ATM monomers in the nucleus [19,16]. One in the nucleus, the ATM monomers trigger phosphorylation of H2AX protein, which 1) initiates the recognition of DSB managed by NHEJ; 2) inhibits the activity of MRE11 nuclease (Fig.7). If the ATM nucleo-shuttling is delayed by interaction of TSC proteins with ATM, the recognition of DSB by NHEJ is less efficient and more DSB are managed by the MRE11-dependent repair pathway. As a result, cells are more radiosensitive and more susceptible to transformation. Any acceleration of the ATM nucleo-shuttling, like when cells are treated with ZOPRA may render TSC cells more radioresistant and less transformable (Fig. 7). However, unlike huntingtin whose mutations lead to the formation of a polyQ domain that interacts with ATM [21], how TSC proteins would delay the ATM nucleoshuttling significantly? As specified above, TSC patients hold heterozygous mutated of TSC proteins that are characterized by a *higher* expression than controls, probably because of a deregulation. Hence, more TSC proteins may sequestrate more ATM monomers in cytoplasm. Altogether, these hypotheses provide one of the first mechanistic models of the action of TSC after irradiation (Fig. 7).

Acknowledgements

This work was supported by the Institut National du Cancer (INCA), (APRAT), the Plan Cancer / AVIESAN grants, the Commissariat General à l'Investissement (Programmes Investissement d'avenir – projet INDIRA), the Association Pour la Recherche sur l'Ataxie-Telangiectasie and the Association Neurofibromatose et Recklinghausen (ANR).

References

1. Bourneville D-M (1880) Sclérose tubéreuse des circonvolution cérébrales: Idiotie et épilepsie hemiplégique. Archives de Neurologie 1:81-91
2. Baskin HJ, Jr. (2008) The pathogenesis and imaging of the tuberous sclerosis complex. Pediatric radiology 38 (9):936-952.
3. Sahin M, Henske EP, Manning BD, Ess KC, Bissler JJ, Klann E, Kwiatkowski DJ, Roberds SL, Silva AJ, Hillaire-Clarke CS, Young LR, Zervas M, Mamounas LA, Tuberous Sclerosis Complex Working Group to Update the Research P (2016) Advances and Future Directions for Tuberous Sclerosis Complex Research: Recommendations From the 2015 Strategic Planning Conference. Pediatric neurology 60:1-12.
4. Henske EP, Jozwiak S, Kingswood JC, Sampson JR, Thiele EA (2016) Tuberous sclerosis complex. Nature reviews Disease primers 2:16035.
5. Napolioni V, Curatolo P (2008) Genetics and molecular biology of tuberous sclerosis complex. Current genomics 9 (7):475-487.
6. van Slegtenhorst M, de Hoogt R, Hermans C, Nellist M, Janssen B, Verhoef S, Lindhout D, van den Ouweland A, Halley D, Young J, Burley M, Jeremiah S, Woodward K, Nahmias J, Fox M, Ekong R, Osborne J, Wolfe J, Povey S, Snell RG, Cheadle JP, Jones AC, Tachataki M, Ravine D, Sampson JR, Reeve MP, Richardson P, Wilmer F, Munro C, Hawkins TL, Sepp T, Ali JB, Ward S, Green AJ, Yates JR, Kwiatkowska J, Henske EP, Short MP, Haines JH, Jozwiak S, Kwiatkowski DJ (1997) Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. Science 277 (5327):805-808
7. European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis C (1993) Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16. Cell 75 (7):1305-1315
8. Hoogeveen-Westerveld M, Ekong R, Povey S, Karbassi I, Batish SD, den Dunnen JT, van Eeghen A, Thiele E, Mayer K, Dies K, Wen L, Thompson C, Sparagana SP, Davies P, Aalfs C, van den Ouweland A, Halley D, Nellist M (2012) Functional assessment of TSC1 missense variants identified in individuals with tuberous sclerosis complex. Human mutation 33 (3):476-479.
9. Hoogeveen-Westerveld M, Ekong R, Povey S, Mayer K, Lannoy N, Elmslie F, Bebin M, Dies K, Thompson C, Sparagana SP, Davies P, van Eeghen AM, Thiele EA, van den Ouweland A, Halley D, Nellist M (2013) Functional assessment of TSC2 variants identified in individuals with tuberous sclerosis complex. Human mutation 34 (1):167-175.
10. Hoogeveen-Westerveld M, Wentink M, van den Heuvel D, Mozaffari M, Ekong R, Povey S, den Dunnen JT, Metcalfe K, Vallee S, Krueger S, Bergoffen J, Shashi V, Elmslie F, Kwiatkowski D, Sampson J, Vidales C, Dzarir J, Garcia-Planells J, Dies K, Maat-Kievit A, van den Ouweland A, Halley D, Nellist M (2011) Functional assessment of variants in the TSC1 and TSC2 genes identified in individuals with Tuberous Sclerosis Complex. Human mutation 32 (4):424-435.
11. Qin J, Wang Z, Hoogeveen-Westerveld M, Shen G, Gong W, Nellist M, Xu W (2016) Structural Basis of the Interaction between Tuberous Sclerosis Complex 1 (TSC1) and Tre2-Bub2-Cdc16 Domain Family Member 7 (TBC1D7). Journal of biological chemistry 291 (16):8591-8601.
12. Overwater IE, Swenker R, van der Ende EL, Hanemaayer KB, Hoogeveen-Westerveld M, van Eeghen AM, Lequin MH, van den Ouweland AM, Moll HA, Nellist M, de Wit MY (2016) Genotype and brain pathology phenotype in children with tuberous sclerosis complex. European journal of human genetics : EJHG. doi:10.1038/ejhg.2016.85
13. Jentarra GM, Rice SG, Olfers S, Saffen D, Narayanan V (2011) Evidence for population variation in TSC1 and TSC2 gene expression. BMC medical genetics 12:29.

14. Alexander A, Cai SL, Kim J, Nanez A, Sahin M, MacLean KH, Inoki K, Guan KL, Shen J, Person MD, Kusewitt D, Mills GB, Kastan MB, Walker CL (2010) ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107 (9):4153-4158.
15. Bodgi L, Foray N (2016) The nucleo-shuttling of the ATM protein as a basis for a novel theory of radiation response: resolution of the linear-quadratic model. International journal of radiation biology 92:117-131
16. Granzotto A, Benadjaoud MA, Vogin G, Devic C, Ferlazzo ML, Bodgi L, Pereira S, Sonzogni L, Forcheron F, Viau M, Etaix A, Malek K, Mengue-Bindjeme L, Escoffier C, Rouvet I, Zabot MT, Joubert A, Vincent A, Venezia ND, Bourguignon M, Canat EP, d'Hombres A, Thebaud E, Orbach D, Stoppa-Lyonnet D, Radji A, Dore E, Pointreau Y, Bourgier C, Leblond P, Defachelles AS, Lervat C, Guey S, Feuvret L, Gilsoul F, Berger C, Moncharmont C, de Laroche G, Moreau-Claeys MV, Chavaudra N, Combemale P, Biston MC, Malet C, Martel-Lafay I, Laude C, Hau-Desbat NH, Zioueche A, Tanguy R, Sunyach MP, Racadot S, Pommier P, Claude L, Baleydier F, Fleury B, de Crevoisier R, Simon JM, Verrelle P, Peiffert D, Belkacemi Y, Bourhis J, Lartigau E, Carrie C, De Vathaire F, Eschwege F, Puisieux A, Lagrange JL, Balosso J, Foray N (2016) Influence of Nucleoshuttling of the ATM Protein in the Healthy Tissues Response to Radiation Therapy: Toward a Molecular Classification of Human Radiosensitivity. International journal of radiation oncology, biology, physics 94 (3):450-460.
17. Rothkamm K, Lobrich M (2003) Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100 (9):5057-5062
18. Joubert A, Zimmerman KM, Bencokova Z, Gastaldo J, Rénier W, Chavaudra N, Favaudon V, Arlett C, 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? International journal of radiation biology 84 (2):1-19
19. Bodgi L, Granzotto A, Devic C, Vogin G, Lesne A, Bottollier-Depois JF, Victor JM, Maalouf M, Fares G, Foray N (2013) A single formula to describe radiation-induced protein relocalization: towards a mathematical definition of individual radiosensitivity. Journal of theoretical biology 333:135-145
20. Ferlazzo ML, Foray N (2016) Huntington Disease: A Disease of DNA Methylation or DNA Breaks? The American journal of pathology 186 (7):1750-1753.
21. Ferlazzo ML, Sonzogni L, Granzotto A, Bodgi L, Lartin O, Devic C, Vogin G, Pereira S, Foray N (2014) 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 49:1200-1211.
22. Deschavanne PJ, Fertil B (1996) A review of human cell radiosensitivity in vitro. International journal of radiation oncology, biology, physics 34 (1):251-266
23. Paterson MC, Sell BM, Smith BP, Bech-Hansen NT (1982) Impaired colony-forming ability following gamma irradiation of skin fibroblasts from tuberous sclerosis patients. Radiation research 90 (2):260-270
24. Hayashi A, Yoshida Y, Tanaka H, Arima M, Ohno K (1985) Variable radiosensitivity in fibroblasts from patients with tuberous sclerosis. Journal of investigative dermatology 84 (1):77-78
25. Scudiero DA, Moshell AN, Scarpinato RG, Meyer SA, Clatterbuck BE, Tarone RE, Robbins JH (1982) Lymphoblastoid lines and skin fibroblasts from patients with tuberous sclerosis are abnormally sensitive to ionizing radiation and to a radiomimetic chemical. Journal of investigative dermatology 78 (3):234-238

26. 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 biology 72 (3):271-283
27. Foray N, Fertil B, Alsbeih MG, Badie C, Chavaudra N, Iliakis G, Malaise EP (1996) Dose-rate effect on radiation-induced DNA double-strand breaks in the human fibroblast HF19 cell line. International journal of radiation biology 69 (2):241-249
28. Au KS, Williams AT, Roach ES, Batchelor L, Sparagana SP, Delgado MR, Wheless JW, Baumgartner JE, Roa BB, Wilson CM, Smith-Knuppel TK, Cheung MY, Whittemore VH, King TM, Northrup H (2007) Genotype/phenotype correlation in 325 individuals referred for a diagnosis of tuberous sclerosis complex in the United States. Genetics in medicine 9 (2):88-100.
29. 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 (2008) Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging. Nature medicine 14 (7):767-772
30. Badie C, Iliakis G, Foray N, Alsbeih G, Cedervall B, Chavaudra N, Pantelias G, Arlett C, Malaise EP (1995) 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 144 (1):26-35
31. Foray N, Marot D, Gabriel A, Randrianarison V, Carr AM, Perricaudet M, Ashworth A, Jeggo P (2003) A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. EMBO journal 22 (11):2860-2871
32. Foray N, Bourguignon M, Hamada N (2016) Individual response to ionizing radiation. Mutation Research Review 770:369-386
33. Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ (2001) ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. Journal of biological chemistry 276 (45):42462-42467
34. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. Journal of biological chemistry 273 (10):5858-5868
35. Bakkenist CJ, Kastan MB (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. Nature 421 (6922):499-506
36. Duchemann B, Wong S, Baruch-Hennequin V, Rivera S, Quero L, Hennequin C (2013) [Hypersensitivity to radiation therapy in a patient with tuberous sclerosis: biological considerations about a clinical case]. Cancer radiotherapie 17 (1):50-53.
37. Yoshida Y, Hayashi A, Arima M (1985) Rapid rejoining of X-ray-induced DNA single-strand breaks in tuberous sclerosis fibroblasts. Mutat Res 146 (2):211-218
38. Matsumura H, Takimoto H, Shimada N, Hirata M, Ohnishi T, Hayakawa T (1998) Glioblastoma following radiotherapy in a patient with tuberous sclerosis. Neurologia medico-chirurgica 38 (5):287-291
39. Curatolo P, Bjornvold M, Dill PE, Ferreira JC, Feucht M, Hertzberg C, Jansen A, Jozwiak S, Kingswood JC, Kotulska K, Macaya A, Moavero R, Nabbout R, Zonnenberg BA (2016) The Role of mTOR Inhibitors in the Treatment of Patients with Tuberous Sclerosis Complex: Evidence-based and Expert Opinions. Drugs 76 (5):551-565.
40. Curatolo P, Moavero R (2012) mTOR Inhibitors in Tuberous Sclerosis Complex. Current neuropharmacology 10 (4):404-415.
41. Franz DN, Belousova E, Sparagana S, Bebin EM, Frost MD, Kuperman R, Witt O, Kohrman MH, Flamini JR, Wu JY, Curatolo P, de Vries PJ, Berkowitz N, Niolat J, Jozwiak S

(2016) Long-Term Use of Everolimus in Patients with Tuberous Sclerosis Complex: Final Results from the EXIST-1 Study. PloS one 11 (6):e0158476.

Table 1: Major studies about the radiobiological characterization of TSC cells

TSC cell lines used (number)	Results	Genotoxic treatments	Method used	Reference
Skin fibroblasts (4)	Enhanced sensitivity to inactivation for 3/4 of tested cell lines.	γ-irradiation under normoxia or hypoxia.	Colony formation	[23]
Skin fibrobasts (13)	5 strains no significant radiosensitivity Confirmation of the RS of the 3 cell lines of paper 23	X-rays	Colony formation	[24]
Lymphoblastoid lines (2) and Skin fibroblasts (2)	Radiosensitivity, UV sensitivity And chemo sensitivity	X-rays, UV and radiomimetic chemical	Colony formation, Trypan blue exclusion	[25]
Skin fibroblasts (3)	Enhanced radiosensitivity	X-rays	Colony formation, H2AX, pATM and MRE11 immunofluorescence	This study

Table 2: Clinical and genomic characteristics of the donors of the TSC fibroblast cell lines examined in this study

Donor / cell line	Age/Race/Gender	Clinical symptoms[1]	Genomics[1]
GM06100 See also [28]	22 y black female	seizures; hypomelanotic macules on left cheek; facial angiofibromas; confetti like hypopigmented macules scattered over lower legs; shagreen patches on posterior right shoulder, mid-upper back, mid-lower back, and right posterior thigh; adenoma sebaceum; two small scalp papules; ungual fibromas on left thumb and index finger and right thumb, index finger and middle finger; decreased visual acuity in right eye	splice acceptor mutation in the TSC2 gene [2743-1G>A] resulting in a skipped exon; polymorphisms in the TSC2 gene include 1100G>A, 2546-12C>T, 2639+44C>G, 2580T>C, and 5202T>C;
GM06121 See also [28]	22 y Caucasian male	seizures began at 5 months of age; walked at 12 months of age; speech delay (spoke at 2.5-3 years old); retinal lesion at inferior medial aspect of the left disc; adenoma sebaceum on the face; multiple ash-leaf hypopigmented macules over the back, arm and chest; confetti-like hypopigmented macules on lower legs; papular fibromatous lesions over the posterior trunk; 3 cm shagreen patch on right flank; skin tags on anterior chest and neck; irregular cafe-au-lait spot over the left trunk and left knee; multiple ungual fibromas on fingers and toes; fibromas on the forehead and scalp	no mutations were identified in the TSC1 or TSC2 genes using PCR direct sequencing of all coding exons and 50 bases of the flanking intron; polymorphisms in TSC2 include 1578C>T, 1600-14C>T, 2546-12C>T, 2580T>C, 2639+44C>G, 5202T>C, and 5397G>C;
GM01635 See also [23]	17 y black male	radiosensitivity	unspecified

[1] As reported by the Coriell Institute, Camden, New Jersey, 08103, USA and evoked in

Legend to figures

Figure 1: Subcellular localization of TSC and mTOR proteins. A. Immunofluorescence was applied to the 1BR3 (radioresistant controls) and GM06100 (*TSC2*-mutated) fibroblast cell lines. White bar indicates 10 μm. **B.** Representative immunoblots with tuberin from cytoplasmic (30 μg) and nuclear extracts (30 μg) after 2 Gy. It is noteworthy that since the conditions of protein extraction are different between cytoplasmic and nuclear extracts, a simple quantitative comparison between both immunoblots may be biased. The α-tubulin and the topoisomerase were taken as loading controls. NI means non-irradiated cells.

Figure 2: Cellular radiosensitivity and micronuclei. A. Clonogenic cell survival applied to the radioresistant, *TSC2*- (GM06100) and *ATM*-mutated (AT4BI) fibroblast cell lines. The dotted lines shows the survival data obtained from the GM01635 in [24]. Each plot represents the mean ± SEM of at least two replicates. **B.** Percentage of cells showing micronuclei after 2 Gy following by 24 h for repair. Each plot represents the mean ± SEM of at least two replicates.

Figure 3: Anti-γH2AX immunofluorescence applied to TSC fibroblasts. A. TSC and radioresistant control fibroblasts were exposed at 2 Gy X-rays following the indicated times for repair. The number of γH2AX foci was plotted against repair times. Each plot represents the mean ± standard error (SEM) of at least three replicates. Representative photo of γH2AX- and DAPI-stained nuclei of the GM06100 fibroblasts after 2 Gy followed by 24 h. White bar indicates 10 μm. **B.** Percentage of γH2AX foci assessed at 10 min of the panel A reported in an histogramm. Each plot represents the mean ± SEM of at least three replicates. **C.** Correlation between the surviving fraction at 2 Gy (SF2) and the corresponding percentage of γH2AX foci remaining after 24 h after 2 Gy X-rays. Corresponding survival and DSB data plots of the *TSC2*-mutated

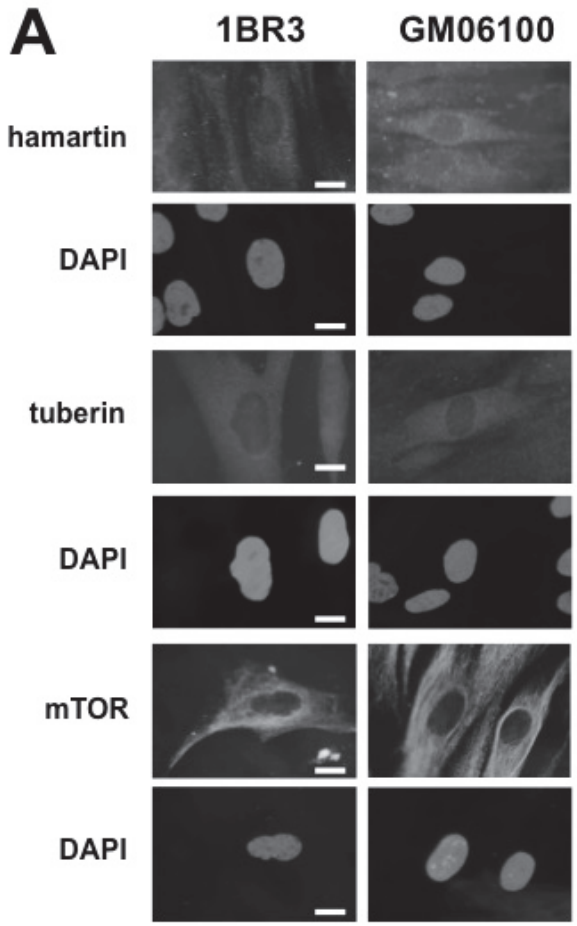
GM06100 fibroblasts were included (mean ± SEM of at least three replicates). Cellular radiosensitivity (SF2) was found to be inversely proportional to the corresponding percentage of γH2AX foci remaining at 24 h post-irradiation ($SF2 = 100 / (\gamma H2AX_{24\,h} + 1) - 1$; $r = 0.76$; $p<0.03$) (solid line). [18].

Figure 4: ATM activity in TSC fibroblasts. A. Anti-*pATM* immunofluorescence was applied to the TSC fibroblasts after 2 Gy following by the indicated times. Each plot represents the mean ± SEM at least three replicates. Representative photo of pATM- and DAPI-stained nuclei of the GM06100 fibroblasts after 2 Gy followed by 10 min. White bar indicates 10 μm. **B.** Representative immunoblots with pATM from nuclear extracts (30 μg) of the indicated cell lines after 2 Gy X-rays. The topoisomerase was taken as loading controls. NI means non-irradiated cells. **C.** Representative ATM immunoprecipitation (IP) of 30 μg cytoplasmic extracts of the indicated cell lines followed by tuberin immunobloting. Immunoglobulin G was used as loading controls.

Figure 5: MRE11 activity in TSC fibroblasts. Anti-*MRE11* immunofluorescence was applied to the TSC fibroblasts after 2 Gy following by the indicated times. Each plot represents the mean ± SEM of at least three replicates.

Figure 6: Statin and biphosphonate (ZOPRA treatment) increases the radioresistance of TSC cells. γH2AX immunofluorescence was applied to 1BR3 and GM06100 treated or not with ZOPRA treatment after 2 Gy followed by 10 min (A) or 24h (B). pATM immunofluorescence was applied to 1BR3 GM06100 treated or not with ZOPRA treatment after 2 Gy followed by 10 min (C). Each plot represents the mean ± SEM of at least two replicates.

Figure 7: Tentative model of the biological role of TSC2 protein. In cytoplasm, ATM interacts with the TSC complex that contributes to inhibit the mTOR pathway. After irradiation, the ATM protein translocates into the nucleus in which the nuclear forms of phosphorylated forms of H2AX appear as γH2AX foci. In the case of mutations of TSC2 protein, the TSC1 and TSC2 proteins separate which contributes to activate the mTOR pathway. In parallel, the over-expression of TSC2 protein contributes to sequestrate ATM in the cytoplasm. Consequently, DSB recognition via NHEJ pathway is impaired and MRE11 nuclease stimulated: DSB are either unrepaired or misrepaired which increases radiosensitivity and cancer proneness.


A
1BR3
GM06100
hamartin
DAPI
tuberin
DAPI
mTOR
DAPI

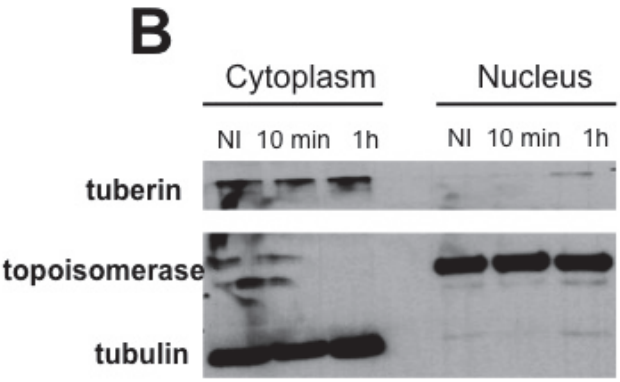

B
Cytoplasm
Nucleus
NI 10 min 1h
NI 10 min 1h
tuberin
topoisomerase
tubulin

Figure 1

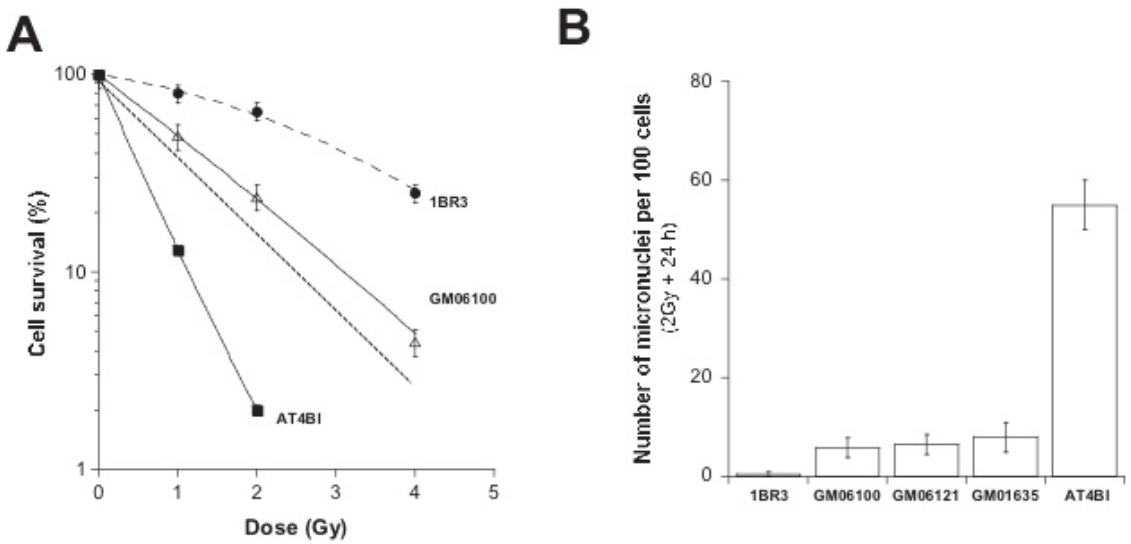

A
100
10
1
Cell survival (%)
0
1
2
3
4
5
Dose (Gy)
1BR3
GM06100
AT4BI
B
Number of micronuclei per 100 cells
(2Gy + 24 h)
80
60
40
20
0
1BR3
GM06100
GM06121
GM01635
AT4BI

Figure 2

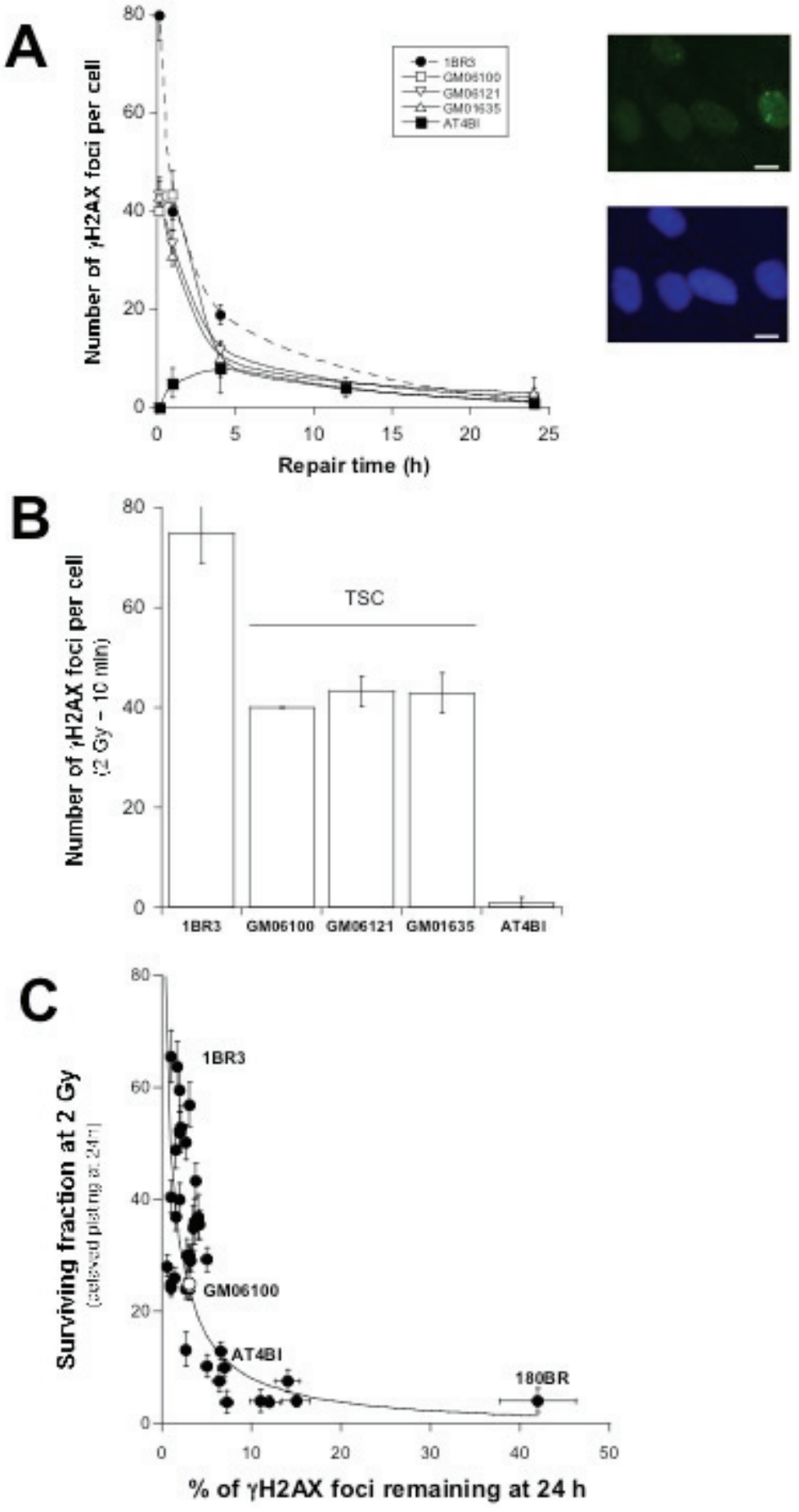

A
Number of γH2AX foci per cell
Repair time (h)
1BR3
GM06100
GM06121
GM01635
AT4BI
B
Number of γH2AX foci per cell
(2 Gy – 10 min)
TSC
1BR3
GM06100
GM06121
GM01635
AT4BI
C
Surviving fraction at 2 Gy
(delayed plating at 24 h)
1BR3
GM06100
AT4BI
180BR
% of γH2AX foci remaining at 24 h

Figure 3

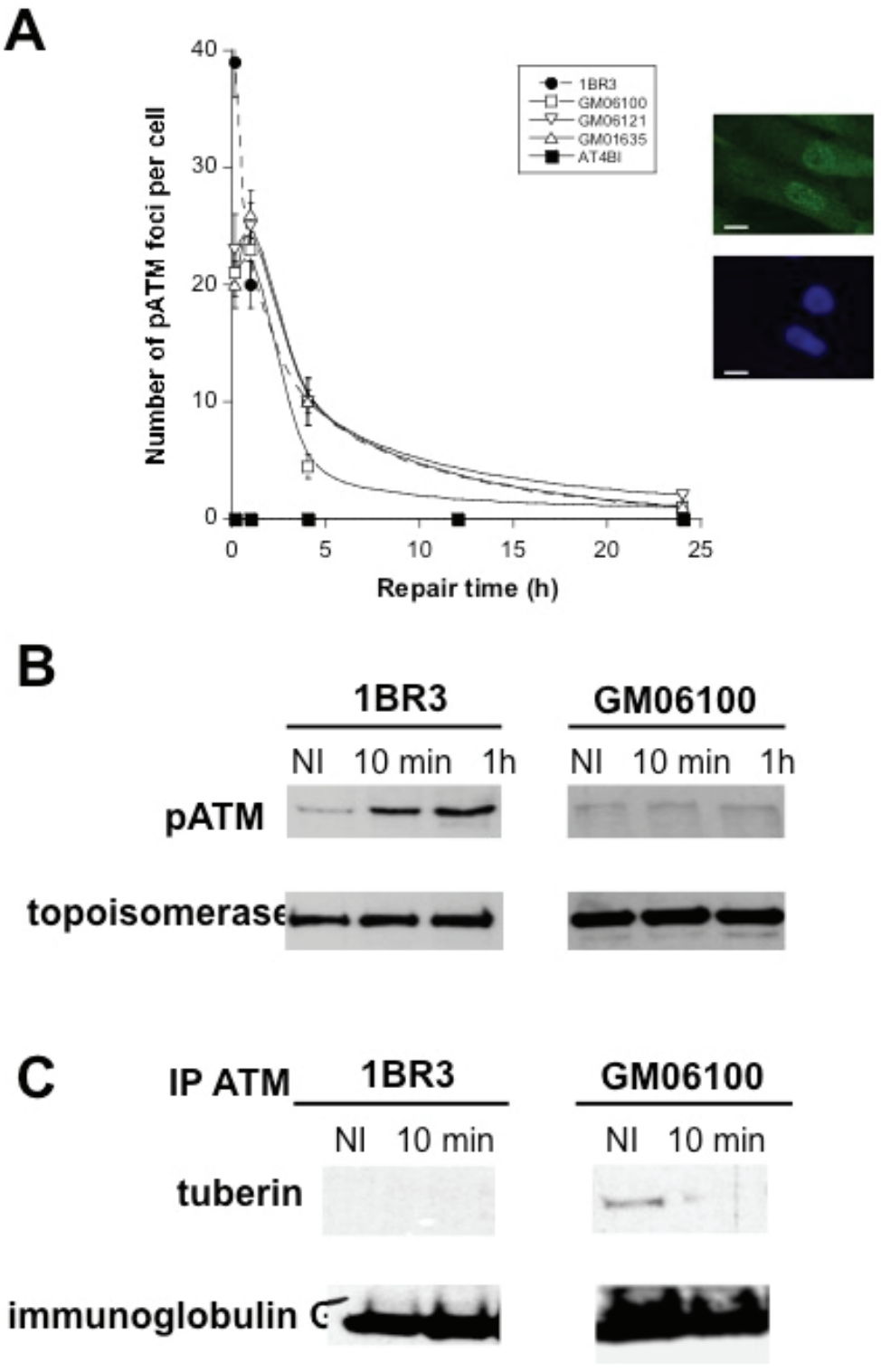

A
Number of pATM foci per cell
Repair time (h)
1BR3
GM06100
GM06121
GM01635
AT4BI
B
1BR3
GM06100
NI
10 min
1h
pATM
topoisomerase
C
IP ATM
1BR3
GM06100
NI
10 min
tuberin
immunoglobulin G

Figure 4

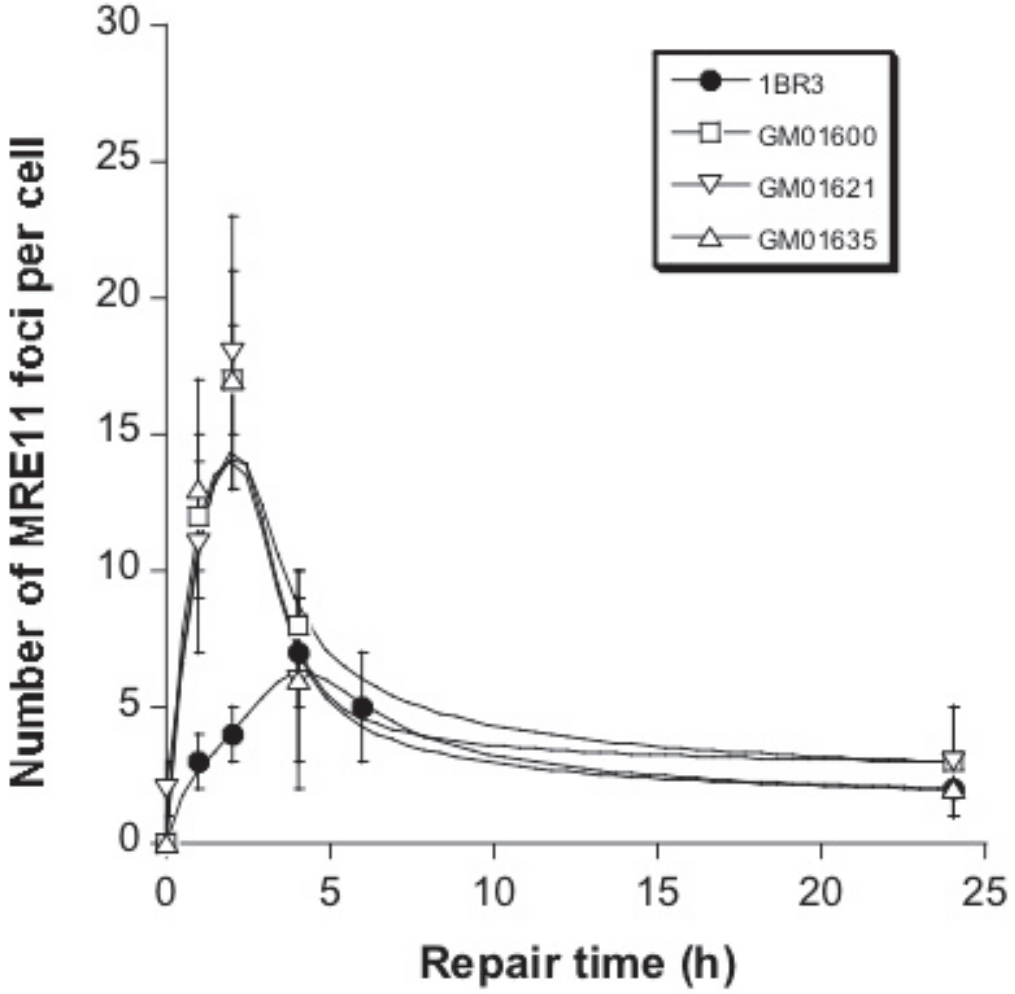

Number of MRE11 foci per cell
Repair time (h)
1BR3
GM01600
GM01621
GM01635
0
5
10
15
20
25
30

Figure 5

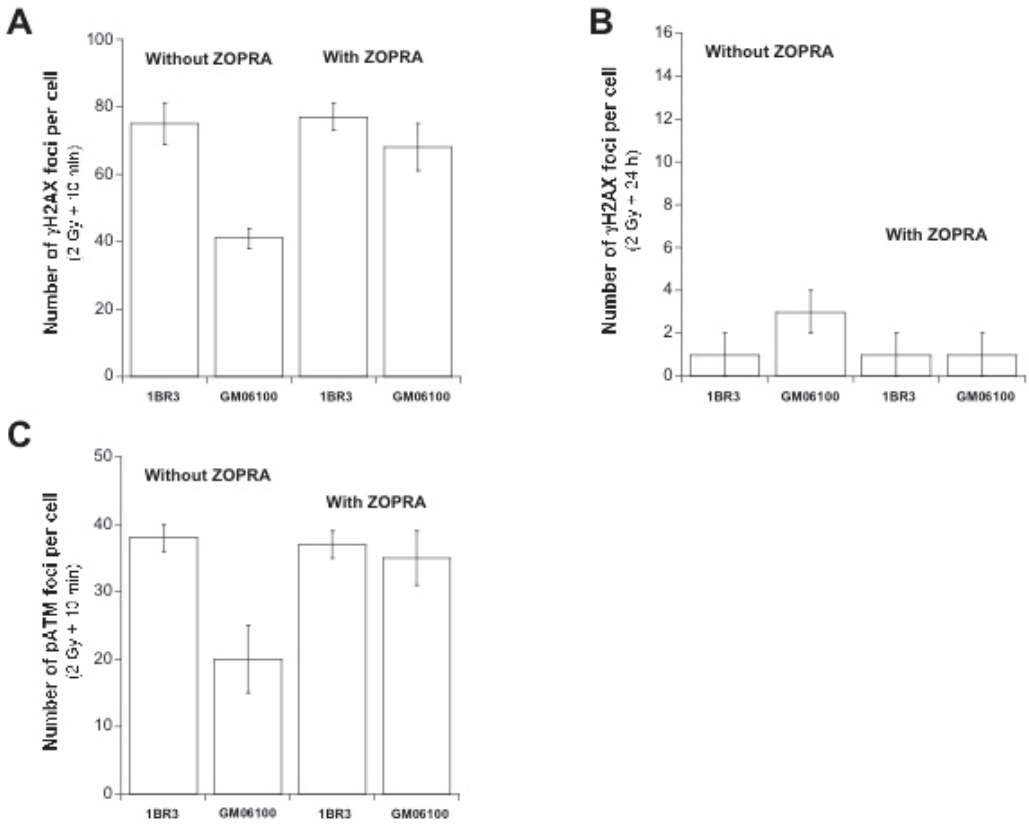

A
Without ZOPRA
With ZOPRA
Number of γH2AX foci per cell
(2 Gy + 10 min)
100
80
60
40
20
0
1BR3
GM06100
1BR3
GM06100
B
Without ZOPRA
With ZOPRA
Number of γH2AX foci per cell
(2 Gy + 24 h)
16
14
12
10
8
6
4
2
0
1BR3
GM06100
1BR3
GM06100
C
Without ZOPRA
With ZOPRA
Number of pATM foci per cell
(2 Gy + 10 min)
50
40
30
20
10
0
1BR3
GM06100
1BR3
GM06100

Figure 6

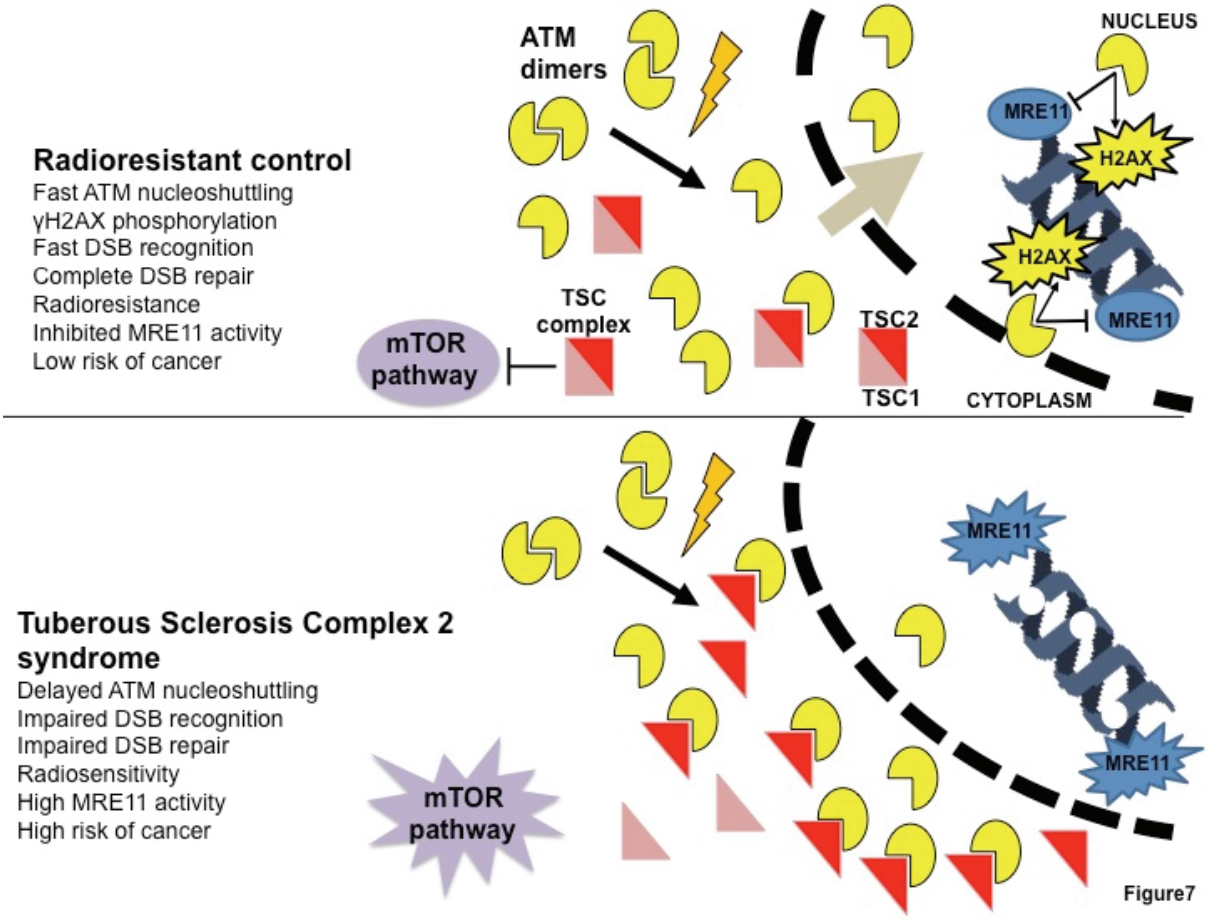

Radioresistant control
Fast ATM nucleoshuttling
γH2AX phosphorylation
Fast DSB recognition
Complete DSB repair
Radioresistance
Inhibited MRE11 activity
Low risk of cancer
ATM dimers
NUCLEUS
MRE11
H2AX
H2AX
MRE11
TSC complex
mTOR pathway
TSC2
TSC1
CYTOPLASM
Tuberous Sclerosis Complex 2 syndrome
Delayed ATM nucleoshuttling
Impaired DSB recognition
Impaired DSB repair
Radiosensitivity
High MRE11 activity
High risk of cancer
MRE11
MRE11
mTOR pathway

Figure7

ARTICLE V

Prenylation inhibitors partially rescue normal ATM-dependent DNA repair in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome cells

Sandrine Pereira[1*], Catherine Massart[1], Adeline Granzotto[1], Larry Bodgi[1], Muriel Viau[1], Mélanie L. Ferlazzo1, Clément Devic1, Karim Malek1, Pierre Cau[2], Nicolas Lévy[2,3*] and Nicolas Foray[1,3]

[1]Inserm, UMR1052, Centre de Recherches en Cancérologie de Lyon, Lyon, France;
2Inserm, UMR-S 910, Faculté de Médecine, Université de la Méditerranée, 13385, Marseille, France;

[3]These two authors have contributed equally to the work

Running title: DSB repair in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome

Keywords: progeria, DSB repair, radiosensitivity, prenylation

Pages: 28 and

Fig.s : 8

Table : 2

[*]Correspondence to: *Sandrine PEREIRA* – Groupe de radiobiologie, INSERM,
Email : s.pereira@neolysdiagnostics.com

Summary

The Hutchinson-Gilford Progeria syndrome (HGPS), is a major premature ageing disease caused by a specific heterozygous mutation in the *LMNA* gene. This mutation leads to the production of progerin, a 50 amino-acids deleted prelamin A that keeps its farnesyl anchor. Recently, we provided evidence that the inhibition of the prenylation of progerin caused by pravastatin and zoledronate (ZoPra), partially rescued the aging phenotype and some defects in the repair of X-rays-induced DNA double-strand breaks (DSBs) in HGPS cell lines. Here, we examined the constitutive and the X-rays-induced phosphorylation of the major ATM substrates involved in the DSB repair and signalling pathways in HGPS fibroblasts. HGPS was found to be associated with an early impaired ATM kinase activity whose consequences are the lack of DSB recognition, the early inhibition of the DNA-PK kinase and the overactivation of the MRE11-dependent DSB repair pathway leading together to radiosensitivity and genomic instability. One of the cellular consequences of such inhibition is the impaired phosphorylation of CHK2. These phenotypes were partially or totally rescued by ZoPra. Our findings suggest that the presence of progerin impairs the nucleo-shuttling of ATM and reduces the activation of the ATM-dependent DNA repair and signalling pathways.

Introduction

Most of laminopathies are caused by mutations in the *LMNA* gene encoding A-type lamins that are the major components of the nuclear skeleton. Laminopathies consist in a wide spectrum of phenotypes ranging from tissue specific features to severe and systemic disorders generally classified as *premature aging syndromes* [1]. Among them, the Hutchinson-Gilgord Progeria Syndrome (HGPS) is an exceedingly rare and devastating disorder, post-natally occurring and characterized by diverse clinical features including premature and accelerated ageing [2]. The most common mutation identified in HGPS syndrome is a *de novo* heterozygous mutation of *LMNA* resulting in the activation of a cryptic splicing donor site in exon 11 leading to a subsequent deletion embarking the last 150 bp of exon 11 [3] [4]. The 50 aminoacids deleted prelamin A, called progerin, lacks the recognition site and is not cleaved by the ZMPSTE24 protease and therefore retains the farnesylated cysteine residues. In HGPS cells, significant changes due to this *LMNA* mutation are observed in the nuclear shape: herniation of the nuclear envelope, thickening of the nuclear lamina, loss of peripheral heterochromatin, and clustering of nuclear pore complexes. All these changes have been related to an abnormal accumulation of progerin in the nuclear lamina associated to a decrease of normal soluble lamin A in the nuclear lamina and matrix [5]. Recently, some studies demonstrated that the abnormal association of progerin with membranes during mitosis impairs the targeting of the nuclear envelope components to daughter cell nuclei in the late telophase/early G1 phase. These defects likely lead to a deleterious impact on cell cycle progression [6]. Since the accumulation of such farnesylated forms of lamin A in the nuclear lamina impacts upon cell morphology and cell cycle, these observations lead to the hypothesis of the *toxicity* of progerin [7].

The presence of progerin deregulates some p53-dependent pathways and some DNA damage processing machineries by impairing the recruitment of DNA repair factors at damage sites (e.g. [8]). Varela et al. [9] have notably demonstrated that accumulation of farnesylated prelamin A in *Zmpste24*-deficient fibroblast nuclei leads to the activation of some p53-dependent signalling pathways and to the over-expression of many essential p53 targets, causing a senescent cellular phenotype. Besides, *Zmpste24*$^{-/-}$ x *p53*$^{-/-}$ mice elicited a partially restored phenotype [9] [10]. Interestingly, p53 activation generally leads to deleterious effects on bone development, as it is commonly observed in HGPS [11]. Since p53 activation is triggered by DNA damage [12] [13]. a particular focus has been made on DNA damage repair and signalling pathways in HGPS for the last past years (Table 1). Recent studies have notably shown that DNA double-strand breaks (DSB) typically accumulate in HGPS cells and that the resulting genome instability might contribute to premature aging [8] [14]. However, to the notable exception of references [8] [15], most studies about DNA repair and signalling in HGPS human cells concerned X-rays-induced DNA *single*-strand breaks (SSBs) or *spontaneous* DSBs (Table 1). Furthermore, a rapid overview of literature about progeroid syndromes indicates that few studies in human cells have been performed with X-rays, a very common DSB inducer (Table 1). Hence, the nature of DSB repair impairments that would be specific to the HGPS syndrome is still unknown and further investigations are therefore needed to elucidate the potential interplay between lamin A and DSB repair and signalling machinery.

Our understanding of the role of the DSB repair has considerably progressed all along these last years. DSBs are considered as the key-lesions for radiation-induced cell lethality and misrepaired radiation-induced DSBs are a source of genomic instability leading to cancer proneness [16] [17]. We have recently demonstrated that the intrinsic radiosensitivity (i.e. the clonogenic survival assessed post-irradiation) is quantitatively correlated with the yield of

unrepaired DSBs: about 1-2 residual DSBs per cell are sufficient to cause death [18] [19]. Furthermore, it is known that ATM is found in the cytoplasm in the form of dimers [21]. Irradiation induces oxidising conditions in the cytoplasm which leads to splitting of the dimers to form monomers. The number of these active monomers correlate with the peak number of ATM foci in the nucleus which allows us to determine the patient's radiosensitivity profile [22] [23].

In parallel to the investigations about DSB repair, our understanding in the DNA damage signalling pathways has considerably progressed, as well, especially about the role of the ATM kinase [24]. It have been notably demonstrated that a functional and temporal hierarchy between *ATM*-dependent phosphorylation substrates occurs early after irradiation and conditions the success of DSB recognition, repair, cell cycle arrest and death steps. This is notably the case of γ-H2AX, pDNA-PK, MRE11, CHK2, BRCA1, p53, c-jun substrates [25]. Hence, all these substrates act some minutes or hours post-irradiation and their kinetics of phosphorylation provide an evaluation of the functionality of each step of the DSB management process.

In a recent report, we have shown that the combination of pravastatin and zoledronate (ZoPra), two prenyl group synthesis inhibitors, block progerin prenylation (farnesylation as well as geranyl-geranylation) and restore DSB repair impairments observed in X-rays-irradiated HGPS cell lines [10]. Here, we examined the kinetics of the X-rays-induced phosphorylation of the major ATM substrates in G0/G1 HGPS cells and evaluated the complementation provided by a ZoPra pre-treatment.

Results

Effect of ZoPra treatment on HGPS cells chromatin

Varela et al. [10]. have shown that the combination of pravastatin and zoledronate (ZoPra) leads to the accumulation of unfarnesylated progerin in the nucleoplasm of HGPS fibroblasts [10]. To investigate further the effect of this treatment on the nuclear architecture of HGPS cells, chromatin state was analyzed. HP1α protein is known to be involved in the chromatin organization maintenance and nuclear HP1α foci may serve as quantifiable marker for decondensation chromatin [26]. However, since HP1α foci may be frequently observed with a broad stained background, we considered only HP1α foci as entities of 1 μm only (see Material and methods). HP1α was found to be relocalised as more numerous nuclear foci in HGPS fibroblasts (7 ± 3 per nucleus) than in control cells (2 ± 2 per nucleus) suggesting an abnormally decondensed chromatin ($p=0.05$). Interestingly, while the ZoPra treatment has no effect in control cells, it drastically reduced the number of HP1α foci. Our preliminary data suggest that HP1α foci may be a reliable sensor of DNA *single*-strand breaks (SSBs) (Fig. 1) (Viau et al., in preparation). It is noteworthy that similar data were obtained in another cell line denominated AG011498 (data not shown). Altogether, these data suggest that the significant constitutive genomic instability in HGPS cells, notably due to a chromatin decondensation, can be partially restored by the reduction of progerin farnesylation.

HGPS cells elicit impairment in the γ-H2AX-dependent DSB recognition process

After the observations on spontaneous DNA damage, we focused on the repair and signalling of *X-rays-induced* DSBs. In the 1BR3 radioresistant controls, the recognition and the repair rate of X-rays-induced DSBs were found in good agreement with previously published data showing 40

± 4 γ-H2AX foci per cell per Gy 10 min after irradiation and 2 ± 2 residual γ-H2AX foci after 24 h post-irradiation [18]. In the HGPS fibroblasts, the number of γ-H2AX foci scored 10 min after irradiation in the HGPS cells was found lower than that assessed in the 1BR3 controls (35 ± 2 γ-H2AX foci per cell per Gy; $p<0.05$), suggesting an impairment in the DSB recognition process (Fig. 2). Furthermore, the HGPS fibroblasts showed a slower DSB repair rate notably with a higher amount of persistent pH2AX foci after 2 Gy followed by 24 h post-irradiation (10 ± 2 γ-H2AX foci per cell) ($p<0.03$) (Fig. 2).

While the ZoPra treatment did not alter the kinetics of γ-H2AX foci in 1BR3 cells ($p>0.6$), the DSB repair defect observed in the HGPS cells was found to be similar to those of the 1BR3 controls ($p>0.7$), suggesting that the treatment has permitted to alleviate both the impairment of DSB recognition and the impairment of the γ-H2AX-dependent repair (Fig. 2). All these conclusions were confirmed with the other HGPS cell line AG011498 (data not shown).

Altogether these results show that 14 ± 3% of X-rays induced DSBs remain unrepaired after 24 h post-irradiation in HGPS cells. Recently, we pointed out a quantified correlation between surviving fraction at 2Gy (SF2) and percentage of unrepaired DSBs assessed after 2 Gy followed by 24 h repair from a collection of 40 untransformed human fibroblasts showing a wide range of radiosensitivity [18]. If our γ–H2AX data are plotted against SF2 of GM01972 from [24] (Table 1), the values of the plot are in very good agreement with the quantitative correlation published between clonogenic survival and DSB repair [18] (Fig. 3). Furthermore, it suggests a significant radiosensitivity despite an apparently low yield of unrepaired DNA damage. Lastly, the ZoPra treatment leads to an impressive radioprotection effect (Fig. 3).

HGPS cells elicit abnormal ATM and DNA-PK kinase activities depending of cells aging

Since the ATM kinase was found to be both responsible for the early phosphorylation of H2AX and the radiation-induced activation of DNA-PK, an essential NHEJ factor, the above findings prompted us to examine the nuclear foci caused by the auto-phosphorylation of the ATM kinase (pATM) [27]. In the 1BR3 controls, an exposure to 2 Gy X-rays resulted in an early nucleo-shuttling of the pATM forms and the formation of nuclear pATM foci: more than 40 pATM foci were observed at 10 min post-irradiation. This number progressively decreased with repair time to reach 5.4 ± 2 pATM foci per cell at 24 h post-irradiation. In the AG11498 HGPS fibroblasts, only 20 pATM foci were observed on the nucleus at 10 min post-irradiation (Fig. 4). In the AG01972 HGPS fibroblasts, the pATM forms were localised in cytoplasm essentially. Conversely, no significant difference was observed between the kinetics of appearance and disappearance of pATM foci in the HGPS and 1BR3 cells from 1 to 24 h post-irradiation ($p>0.5$) (Fig. 4). In order to consolidate the results observed by immunofluorescence, an ELISA assay was performed to allow a specific quantification of pATM activated monomers in the cytoplasm and the nucleus. In fact we observed that the maximal quantity of pATM after irradiation in the nucleus is lower in AG11498 HGPD cells than the control cells (table 2).

The ZoPra treatment did not significantly affect the kinetics of pATM foci in the 1BR3 controls, whatever the time post-irradiation ($p>0.7$), nor in the HGPS cells in the 1-24 h post-irradiation range ($p>0.8$). However, it is noteworthy that the number of pATM foci assessed 10 min after irradiation increased drastically from 6 ± 5 in untreated HGPS cells to 24 ± 5 in ZoPra treated HGPS cells (Fig. 4). This last result strongly suggests that the ZoPra treatment partially restores the early inhibition of the ATM kinase activity observed in the HGPS cells. We hypothesized therefore that such partial restoration of ATM kinase activity that occurs early after irradiation may be sufficient to rescue the early H2AX phosphorylation and consequently, the

DSB recognition. Similar conclusions were obtained with the other HGPS cell line AG011498 using an ELISA assay with an increasing of 15 % of the quantity of nuclear pATM (data not shown).

The DNA-PK auto-phosphorylation (pDNA-PK) has been demonstrated to be required for the NHEJ process and can be used as an indicator of the DNA-PK kinase activity [18]. From 40 different human cell lines, our previous findings indicate a nearly one-to-one correlation between γ-H2AX and pDNA-PK foci in normal cells [18]. We investigated therefore the formation and the disappearance of pDNA-PK foci in the HGPS cells. The pDNA-PK data were found similar to that of γ-H2AX foci in the 1BR3 cells, in agreement with previous reports [18]. By contrast, the number of pDNA-PK foci scored 10 min after irradiation in the HGPS fibroblasts was found significantly lower than that observed in the 1BR3 controls ($p < 0.001$). This number was also significantly lower than that of γ-H2AX foci assessed in the HGPS fibroblasts ($p < 0.0001$) (Fig. 5). At 1 h post-irradiation, the number of pDNA-PK foci became similar to that of γ-H2AX foci assessed in the HGPS cells. The rate of pDNA-PK foci disappearance remained however slower than that of the 1BR3 controls from 1 h up to 24 h post-irradiation (Fig. 5). Such pDNA-PK data suggest therefore that the DNA-PK kinase activity required for a normal NHEJ process is impaired in the HGPS fibroblasts tested.

Similarly to what was observed with γ-H2AX data, the ZoPra treatment did not alter the kinetic of pDNA-PK foci in the 1BR3 cells ($p > 0.7$). Conversely, the early activation of the DNA-PK kinase was partially recovered with an amount of DSB assessed 10 min after irradiation of 29 ± 7 pDNA-PK foci per HGPS cell (10 ± 0.5 per untreated HGPS cells) (Fig. 5). Altogether, our findings demonstrate a reduction of the ATM kinase activity in the HGPS cells, which impairs DSB recognition and repair *via* the DNA-PK-dependent NHEJ process.

HGPS cells elicit abnormally high MRE11 activity

The ATM kinase was also shown to interact with a number of proteins substrates involved in the DSB repair pathways. This is notably the case of MRE11 protein, a component of the RAD50-MRE11-NBS1 complex that forms nuclear foci after genotoxic stress [29]. Some authors have proposed that MRE11 participates to the NHEJ pathway, notably on the basis of *co-immunofluorescence* observations showing that MRE11 and γ-H2AX co-localize early after irradiation. However, the involvement of MRE11 in the NHEJ process is still controversial [31]. Furthermore, our recent findings supported that co-immunofluorescence of γ-H2AX and MRE11 may introduce biases due to *the bleed-through* fluorescence phenomenon: in fact, the kinetic of MRE11 foci after 2 Gy X-rays is clearly different from that of γ-H2AX foci [28]. We investigated therefore the occurrence of MRE11 foci in the HGPS fibroblasts. The MRE11 foci in the 1BR3 controls appeared from 2 to 8 h after 2 Gy X-rays and reached their maximal yield at 4 h post-irradiation (Fig. 6). The HGPS fibroblasts showed more MRE11 foci per cell than the 1BR3 controls in the 10 min - 8 h post-irradiation time range, suggesting a deregulation of the MRE11-dependent pathway maybe due to the early impairments observed with γ-H2AX, pDNA-PK and pATM data.

The ZoPra treatment was shown to decrease the differences between the kinetics of appearance/disappearance of MRE11 foci in the HGPS and the 1BR3 cells: only the 1 h data were found different significantly ($p<0.05$) (Fig. 6). Altogether, our findings indicate that the HGPS cells elicit an over-activation of the MRE11-dependent DSB repair pathway, suggesting a more important ratio of mis-repaired DSBs and a higher genomic instability. Similar conclusions were obtained with the other HGPS cell line, AG011498 (data not shown).

HGPS cells elicit abnormal phosphorylation of some ATM substrates such as CHK2

ATM phosphorylates a number of substrates involved in DNA repair, cell cycle checkpoints and cellular death pathways substrates (for reviews see [31] [32] [33]. The immunofluorescence signals with antibodies against the phospho-CHK2^{thr68} (pCHK2) forms were found significantly lower in the HGPS cells than in the 1BR3 fibroblasts. Whether after 2 Gy (data not shown) or 15 Gy (Fig. 7), no significant pCHK2 foci appeared in the HGPS fibroblasts whereas they were systematically present in the irradiated 1BR3 controls.

The ZoPra treatment did not modify significantly the relocalisation of pCHK2 forms in the 1BR3 fibroblasts, whether irradiated or no. Conversely, the ZoPra treatment strongly increased the number of pCHK2 immunofluorescence signals in irradiated HGPS cells (Fig. 7). This result was also confirmed by western blotting (data not shown). Similar conclusions were also reached with other ATM substrates like BRCA1, p-p53^{ser15} and p-c-jun (data not shown).

Discussion

HGPS is associated with radiosensitivity and NHEJ defect

Despite some discrepancies, progeroid syndromes have long been known to be radiosensitive (Table 1). Their radiosensitivity was systematically found higher than radioresistant controls but lower than that of ataxia telangiectasia, the genetic disease associated with the highest radiosensitivity in humans (Table 1) [18]. Here, the number of radiation-induced γ-H2AX foci scored immediately after irradiation in HGPS fibroblasts was significantly higher than that of the 1BR3 controls but systematically lower than the most radiosensitive human cells such as the *ATM*- or *LIG4*-mutated fibroblasts [18] (Fig.3). Hence, our data strongly suggest that the HGPS syndrome belongs to lower limit of the group of genetic syndromes associated with *moderate* radiosensitivity, in very good agreement with a number of papers published in the eighties (see references in Table 1). Such syndromes are notably characterised by a reduced ATM kinase activity leading to an impairment of both the DSB recognition step and the DNA-PK-dependent rejoining step [18]. Here, the γ-H2AX, pDNA-PK and pATM data from HGPS cells are very consistent with such phenotypes.

HGPS is associated with genomic instability and uncontrolled MRE11-dependent pathway

As shown in Fig. 6, the number of MRE11 foci was particularly high and their occurrence was much earlier than in the radioresistant controls. We previously proposed that abnormally high number of MRE11 foci reflects hyperrecombination phenomenon that may lead to genomic instability and misrepaired DSBs [18], in very good agreement with chromosomal aberrations observed routinely in the HGPS cells (Table 1). This hypothesis is also in agreement with the

RAD51 data of Liu et al. [8]. However, although the radiation-induced relocalization of RAD51 was found to be impaired in the HGPS cells, it is noteworthy that the RAD51 protein is more likely involved in the homologous recombination process, a DSB repair pathway only active in S-G2/M [18]. In this report, the cells are in G0/G1 mainly. Liu et al. [8] also investigated the co-localisation of 53BP1 and γ–H2AX foci after X-rays irradiation [8]. However, it must be stressed that the co-immunofluorescence of green-red markers may introduce biases in the data interpretation, notably when γ–H2AX antibodies are used [31]. Furthermore, there is no one-to-one correlation between 53BP1 and γ–H2AX foci in normal human fibroblasts all along the repair of X-rays induced DSBs [18]. Here, our findings support a model for quiescent HGPS fibroblasts in which the impairment of the early ATM activity may lead to a slight defect of the NHEJ DSB repair pathway (less recognized DSBs by H2AX phosphorylation and more residual γ–H2AX foci) and to genomic instability (more MRE11 foci). Further investigations are needed to complete this model for proliferating cells, notably with the impact of the ATR protein [34].

HGPS is associated with abnormal chromatin decondensation

High MRE11 nuclease activity is frequently associated with spontaneous DNA damage, chromatin decondensation and particularly large nuclei. This is notably the case of some cases of *Xeroderma pigmentosum*, Bloom's syndrome and Fanconi Anemia [18]. Interestingly, our HP1α data suggest also an abnormal chromatin decondensation in HGPS cells. Progerin has been demonstrated to cause nuclear envelope alterations and chromatin disorganization, both in cells from HGPS patients and in animal models [35]. Interestingly, heterochromatin (HC) is the most severely affected part of chromatin in premature ageing laminopathies [36]. This is consistent with the straight links that exist between HC, nuclear *lamina* and the inner nuclear membrane. Furthermore, the HGPS cells display altered histone modification patterns, including reduced

heterochromatin-specific trimethylation of Lysine 9 from histone H3 (Tri-Me-K9H3) and an altered association with HP1α) [8]. Non-farnesylated prelamin A causes the redistribution of LAP2α, HP1α and Tri-Me-K9H3, and triggered heterochromatin localization in the nuclear interior. In contrast, the farnesylated lamin A precursor accumulates at the nuclear periphery and causes loss of heterochromatin markers and LAP2α in enlarged nuclei [7] [37] [38]. Such chromatin impairment may therefore contribute to make more difficult the DSB recognition and repair processed.

A link between ageing, nuclear import and DNA repair?

Although the effect of aging on many cellular processes has been investigating, few information is available regarding nuclear import of DNA repair factors and ageing-related DNA damage. Some authors have pointed an age-reduction of nuclear import proteins in human fibroblasts [39] [40] and in some pathologic conditions, impairment of nuclear import could be associated with accumulation of DNA damage [41]. Cell nuclei from old individuals acquire defects similar to those of HGPS patient cells, including changes in histone modifications and increased DNA damage [42].

Indeed a relationship between progeroid syndromes and DNA damage is clearly now established.

Di Masi and collaborators have shown that accumulation of the lamin A precursor protein determines a defect in DNA damage response after X-ray exposure in Mandibuloacral dysplasia type A (MADA; OMIM # 248370) another premature ageing disease [15].

We showed in HGPS cells that accumulation of progerin led to an impairment of DNA repair processes associated with a defect in ATM nucleo-shuttling.

In this study we showed that there is a link between the age of HGPS cells (depending of the passage number) and the delay or the impairement of ATM kinase signalling. In fact, AG11498 HGPS cells with a lower passages number exhibit less nuclear defects we observed a delay in pATM nucleoshutting (20 foci à 10 min post-irradiation) (Fig. 4). AG01972 HGPS cells with a higher passages number exhibit higher nuclear defects and for these cells we observed an impairment of ATM kinase activity (no foci at 10 min post-irradiation) (Fig. 4). Some authors have shown that a prenylation mutant of lamin A co-localizes with the nuclear pore complex proteins, including Nup53 and Nup98 [43]. The impact of prenylated prelamin A on the ATM nucleo-shuttling may be due to its association with and/or its accumulation at the nuclear pore complex and this impact may be enhanced by progerin accumulation in nuclear membranes.

As evoked in Introduction, we previously provided evidence of a functional and temporal hierarchy between ATM-dependent phosphorylation substrates that would conditions the success of DSB recognition, repair, cell cycle arrests and death pathways [25].

Hence, since ATM kinase activity was found impaired in HGPS cells, it was not surprising to observe impaired phosphorylation of BRCA1, p53, CHK2 and c-jun. Particularly, impaired CHK2 phosphorylation and expression may explain cell cycle features commonly observed in progeroid syndromes. Furthermore, impaired c-jun phosphorylation may explain the absence of apoptotic bodies and highlights the predominance of senescence and mitotic death with micronuclei in the HGPS cells (data not shown). Lastly, we provide evidence that the ZoPra treatment partially restores some DNA damage repair and signalling steps in the HGPS cells, which was not the case with FTI treatment [35]. Altogether, the biological consequences of impaired phosphorylations of various ATM substrates made the HGPS syndrome as a very severe and pleiotropic disease.

A tentative model explaining the impairments of DSB repair and signalling in HGPS cells

How to explain the action of lamins A onto ATM? In radioresistant controls, the ATM auto-phosphorylation signals revealed an important number of active ATM forms already present in cytosol. In the first minutes post-irradiation, ATM relocalizes as nuclear foci, suggesting a significant nucleo-shuttling of this protein caused by X-rays. Recently, we have observed that huntingtin, a cytoplasmic protein whose mutations cause Huntington disease can sequestrate monomeric ATM forms in cytoplasm in response to X-rays exposure leading to a delay in the nucleoshuttling of activated pATM forms in the nucleus [44]. A combination of bisphosphonates and statins complements these impairments by facilitating the nucleo-shuttling of ATM, increasing the yield of recognized and repaired DNA double strand breaks [44]. Contrary to that is observed tin the Huntington syndrome, in the progeria cells, nuclear membrane abnormalities induced by a progerin accumulation in the nuclear lamina must be at the basis of the nuclear import impairement of pATM and then leading to the radiosentitivity status observed.

Furthermore, the maximal of nuclear foci of pATM in the nucleus was found predictive of radiosensitivity [22]. These results were coherent with our study since we proved that radiosensitivity can be possibly predicted by the maximal quantity of pATM in the nucleus obtained by the ELISA assay.

We hypothesize here those alterations in lamins A may prevent or, at least, delay the nucleo-shuttling of active ATM forms required for a normal radiation response. In the case of mutations of *LMNA* causing unsoluble fractions of lamin A, the biological consequences may be very similar to mutations of ATM gene itself. An alternative but not exclusive explanation could be that impairment of lamin and nuclear membrane elasticity impact upon chromatin by favouring

its decondensation. Obviously, further experiments are needed to consolidate these two explanations that may be complementary.

Conclusions

As suggested by previous publications in the eighties, progeroid syndromes belong to the group of radiosensitive diseases. With the present data, we have provided elements to better understand the impairments in the DSB repair and signalling pathways observed specifically in HGPS cells and that are at the origin of the genomic instability and ageing of this syndrome. Furthermore, the rescue of some molecular and cellular phenotypes due to the ZoPra treatment suggest also that the nuclear forms of the ATM kinase plays a major role in the management of the DNA damage, whether spontaneous or X-ray-induced, that are observed in the HGPS cells. Finally, all these data put in light the benefit of Zopra treatment on DNA damage repair pathways.

Materials and methods

Cell lines and ZoPra treatment.

Untransformed fibroblast cell lines were chosen for their genomic stability and to avoid any confounding effects of immortalization. The 1BR3 untransformed fibroblast cell line provided from a skin biopsy of a young adult apparently healthy was used as radioresistant control. The radiobiological features of the 1BR3 cell line were abundantly reported [18] [20]. The AG01972 and the AG011498 HGPS fibroblast cell lines were purchased from the Coriell Cell Repositories (Camden, USA) and hold a G608G mutation in the *LMNA* gene. Cells were routinely cultured as monolayers with Dulbecco's modified Eagle's minimum medium (DMEM) (Gibco-Invitrogen-France, France), supplemented with 20% fetal calf serum, penicillin and streptomycin. All the experiments were performed with cells at passages 14, 16, 18 and 22 in plateau phase of growth (95 - 99 % of cells in G0/G1) to overcome any bias generated by cell cycle.

The ZoPra treatment was applied as previously published [10]. Briefly, cells were incubated with 1 μM pravastatin (Sigma-Aldrich France, France) in PBS for 24 h at 37°C. Thereafter, 1 μM zoledronate (Novartis, France) in PBS was added into the culture medium and cells were incubated for 12 h at 37°C. The culture medium was renewed immediately before irradiation.

X-rays irradiations

A Philips X-ray clinical irradiator devoted to research was used to perform all the irradiations. The X-ray beam was produced from a tungsten anode, applying a voltage setting of 200 kV, an intensity of 20 mA and using a filtration of 0.1 mm copper filter. The dose-rate was 1.234 Gy.min [18]. Culture medium was changed before irradiation. Incubation at 37°C was applied immediately after irradiation.

Immunofluorescence

The immunofluorescence protocol employed for DNA repair and signalling actors was described elsewhere (Foray et al., 2003). Briefly, cells were fixed in 3% paraformaldehyde 2% sucrose PBS for 15 min at room temperature and permeabilized in 20 mM HEPES, pH 7.4, 50 mM NaCl, 3 mM $MgCl_2$, 300 mM sucrose 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) for 3 min. Thereafter, coverslips were washed in PBS prior to immunostaining. Primary antibody incubations were performed for 40 min at 37°C in PBS supplemented with 2% bovine serum fraction V albumin (BSA) (Sigma-Aldrich) and followed by PBS washing. Anti-pH2AX^{ser139} antibodies were provided by Upstate Biotechnology (Euromedex) and were used at 1:800. Anti- pDNA-PK^{thr2609} (#ab4194; Abcam), -pATM^{ser1981} (#ab81292; Abcam, -pCHK2^{thr68} (#ab32055; Abcam), p-p53^{ser15} (#ab1431; Abcam), -BRCA1 (#Ab1; Merck Chemicals - Oncogene Research, Nottingham, UK) and -MRE11 (#56211; Abcys, Paris, France), -HP1α (#15.19s2; Millipore SAS-France, Saint-Quentin-Yvelines, France) were used at 1:100. Incubations with anti-mouse fluorescein (FITC) and rhodamine (TRITC) secondary antibodies were performed at 1:100 at 37°C for 20 min. Slides were mounted in 4',6' Diamidino-2-Phényl-indole (DAPI)-stained Vectashield (Abcys) and examined with Olympus fluorescence microscope. Two hundreds nuclei per condition were analyzed. DAPI staining permitted also to indirectly evaluate yield of G_1 cells (nuclei with homogeneous DAPI staining), S cells (nuclei showing numerous pH2AX foci), G_2 cells (nuclei with heterogeneous DAPI staining) and metaphase (visible chromosomes) [18]. It is noteworthy that in our conditions, the ATM and DNA-PK kinases that phosphorylate the H2AX histones require some minutes post-irradiation to be fully active. Consequently, the earliest time post-irradiation was fixed at 10 min, in agreement with previous reports [18]. The quantification of

foci was performed by eye-scoring and verified by semi-automatic scoring Cell^F software from Soft Imaging System GmbH, (Münster, Germany) that permits to quantify nuclei and foci size. By convention, only HP1α larger than 1μm were considered.

ELISA ASSAY

Detection and quantification of pATM proteins was performed according Human phospho-ATM Elisa kit protocol (NOVATEINBIO). Optical Density of a microtiter plate were red at 450 nm using a TECAN Infinite M200 spectrophotometer.

Data fitting

The number of DSB as a function of repair time DSB repair data were fitted to the following formula described previously [ ] with (α, β) representing adjustable parameters and N(t) and N(0) representing the number of DSB at time t and time 0 [25].

Acknowledgements

This work was supported by the Association Pour la Recherche sur l'Ataxie-Telangiectasie (APRAT), the Commissariat Général à l'Investissement (projet INDIRA), the Institut National du Cancer (INCA), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale-France, the Agence Nationale de la Recherche (ANR), Association Française contre les Myopathies and the European Union (FP6 Eurolaminopathies). All the irradiation experiments have been performed at the biomedical facility of European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) (Grenoble, France).

References

[1]. De Sandre-Giovannoli, A. and Levy, N. (2006) Altered splicing in prelamin A-associated premature aging phenotypes. *Prog Mol Subcell Biol,* **44,** 199-232.

[2]. Hennekam, R.C. (2006) Hutchinson-Gilford progeria syndrome: review of the phenotype. *Am J Med Genet A,* **140,** 2603-24.

[3]. De Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Cau, P., Navarro, C., Amiel, J., Boccaccio, I., Lyonnet, S., Stewart, C.L., Munnich, A., Le Merrer, M. *et al.* (2003) Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science,* **300,** 2055.

[4]. Eriksson, M., Brown, W.T., Gordon, L.B., Glynn, M.W., Singer, J., Scott, L., Erdos, M.R., Robbins, C.M., Moses, T.Y., Berglund, P. *et al.* (2003) Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature,* **423,** 293-8.

[5]. Navarro, C.L., Cau, P. and Levy, N. (2006) Molecular bases of progeroid syndromes. *Hum Mol Genet,* **15 Spec No 2,** R151-61.

[6]. Dechat, T., Shimi, T., Adam, S.A., Rusinol, A.E., Andres, D.A., Spielmann, H.P., Sinensky, M.S. and Goldman, R.D. (2007) Alterations in mitosis and cell cycle progression caused by a mutant lamin A known to accelerate human aging. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **104,** 4955-60.

[7]. Goldman, R.D., Shumaker, D.K., Erdos, M.R., Eriksson, M., Goldman, A.E., Gordon, L.B., Gruenbaum, Y., Khuon, S., Mendez, M., Varga, R. *et al.* (2004) Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **101,** 8963-8.

[8]. Liu, B., Wang, J., Chan, K.M., Tjia, W.M., Deng, W., Guan, X., Huang, J.D., Li, K.M., Chau, P.Y., Chen, D.J. *et al.* (2005) Genomic instability in laminopathy-based premature aging. *Nat Med,* **11,** 780-5.

[9]. Varela, I., Cadinanos, J., Pendas, A.M., Gutierrez-Fernandez, A., Folgueras, A.R., Sanchez, L.M., Zhou, Z., Rodriguez, F.J., Stewart, C.L., Vega, J.A. *et al.* (2005) Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. *Nature,* **437,** 564-8.

[10]. Varela, I., Pereira, S., Ugalde, A.P., Navarro, C.L., Suarez, M.F., Cau, P., Cadinanos, J., Osorio, F.G., Foray, N., Cobo, J. *et al.* (2008) Combined treatment with statins and

aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging. *Nat Med,* **14,** 767-72.
[11]. Zambetti, G.P., Horwitz, E.M. and Schipani, E. (2006) Skeletons in the p53 tumor suppressor closet: genetic evidence that p53 blocks bone differentiation and development. *J Cell Biol,* **172,** 795-7.
[12]. Burma, S., Kurimasa, A., Xie, G., Taya, Y., Araki, R., Abe, M., Crissman, H.A., Ouyang, H., Li, G.C. and Chen, D.J. (1999) DNA-dependent protein kinase-independent activation of p53 in response to DNA damage. *J Biol Chem,* **274,** 17139-43.
[13]. 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,** 194-8.
[14]. Manju, K., Muralikrishna, B. and Parnaik, V.K. (2006) Expression of disease-causing lamin A mutants impairs the formation of DNA repair foci. *J Cell Sci,* **119,** 2704-14.
[15]. di Masi, A., D'Apice, M.R., Ricordy, R., Tanzarella, C. and Novelli, G. (2008) The R527H mutation in *LMNA* gene causes an increased sensitivity to ionizing radiation. *Cell Cycle,* **7,** 2030-7.
[16]. Jeggo, P.A. and Lobrich, M. (2007) DNA double-strand breaks: their cellular and clinical impact? *Oncogene,* **26,** 7717-9.
[17]. Harper, J.W. and Elledge, S.J. (2007) The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell,* **28,** 739-45.
[18]. Joubert, A. and Foray, N. (2007) [Intrinsic radiosensitivity and DNA double-strand breaks in human cells]. *Cancer Radiother,* **11,** 129-42.
[19]. Foray, N., Arlett, C. F. and Malaise, E. P (1999). 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**, 1589-95.
[20]. Foray, N., Arlett, C. F. and Malaise, E. P (1999). 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**, 1589-95.
[21] Guo Z, Kozlov S, Lavin MF, Person MD, Paull TT. (2010) ATM activation by oxidative stress. Science. **22**;330(6003):517-21
[22] COPERNIC project investigators, Granzotto A, Benadjaoud MA, Vogin G, Devic C, Ferlazzo ML, Bodgi L, Pereira S, Sonzogni L, Forcheron F, Viau M, Etaix A, Malek K, Mengue-Bindjeme L, Escoffier C, Rouvet I, Zabot MT, Joubert A, Vincent A, Venezia ND, Bourguignon M, Canat EP, d'Hombres A, Thébaud E, Orbach D, Stoppa-Lyonnet D, Radji A, Doré E, Pointreau Y, Bourgier C, Leblond P, Defachelles AS, Lervat C, Guey S, Feuvret L, Gilsoul F, Berger C, Moncharmont C, de Laroche G, Moreau-Claeys MV, Chavaudra N, Combemale P, Biston MC, Malet C, Martel-Lafay I, Laude C, Hau-Desbat NH, Ziouéche A, Tanguy R, Sunyach MP, Racadot S, Pommier P, Claude L, Baleydier F, Fleury B, de Crevoisier R, Simon JM, Verrelle P, Peiffert D, Belkacemi Y, Bourhis J, Lartigau E, Carrie C, De Vathaire F, Eschwege F, Puisieux A, Lagrange JL, Balosso J, **Foray** N. Influence of Nucleoshuttling of the ATM Protein in the Healthy Tissues Response to Radiation Therapy: Toward a Molecular Classification of Human Radiosensitivity. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2016 Mar 1;94(3):450-60
[23] Bodgi L, Canet A, Pujo-Menjouet L, Lesne A, Victor JM, Foray N. Mathematical models of radiation action on living cells: From the target theory to the modern approaches. A historical and critical review. *Journal of theoretical biology* 2016;394:93-101.
[24]. Lobrich, M. and Jeggo, P.A. (2005) The two edges of the ATM sword: co-operation between repair and checkpoint functions. *Radiother Oncol,* **76,** 112-8.

[25]. Foray, N., Marot, D., Gabriel, A., Randrianarison, V., Carr, A.M., Perricaudet, M., Ashworth, A. and Jeggo, P. (2003) A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *Embo J,* **22,** 2860-71.
[26]. Luger, K. and Hansen, J.C. (2005) Nucleosome and chromatin fiber dynamics. *Curr Opin Struct Biol,* **15,** 188-96.
[27]. Weichselbaum, R. R., Nove, J. and Little, J. B. (1980). X-ray sensitivity of fifty-three human diploid fibroblast cell strains from patients with characterized genetic disorders. *Cancer Res* 40, 920-5.
[28]. You, Z., Bailis, J.M., Johnson, S.A., Dilworth, S.M. and Hunter, T. (2007) Rapid activation of ATM on DNA flanking double-strand breaks. *Nat Cell Biol,* **9,** 1311-8.
[29]. Lavin, M.F. (2007) ATM and the Mre11 complex combine to recognize and signal DNA double-strand breaks. *Oncogene,* **26,** 7749-58.
[30]. Di Virgilio, M. and Gautier, J. (2005) Repair of double-strand breaks by nonhomologous end joining in the absence of Mre11. *JCell Biol,* **171,** 765-71.
[31]. Renier, W., Joubert, A., Bencokova, Z., Gastaldo, J., Massart, C. and Foray, N. (2007) Consequences of the bleed-through phenomenon in immunofluorescence of proteins forming radiation-induced nuclear foci. *Int J Radiat Biol,* **83,** 543-9.
[32]. Khanna KK, Lavin MF, Jackson SP, Mulhern TD. ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. Cell Death Differ. 2001 Nov;8(11)
[33]. Lavin MF, Khanna KK. ATM: the protein encoded by the gene mutated in the radiosensitive syndrome ataxia-telangiectasia. Int J Radiat Biol. 1999 Oct;75(10):1201-14.
[34]. Shiloh Y. ATM (ataxia telangiectasia mutated): expanding roles in the DNA damage response and cellular homeostasis. Biochem Soc Trans. 2001 Nov; 29(Pt 6):661-6.
[35]. Liu, Y., Rusinol, A., Sinensky, M., Wang, Y. and Zou, Y. (2006) DNA damage responses in progeroid syndromes arise from defective maturation of prelamin A. *J Cell Sci,* **119,** 4644-9.
[36] Filesi, I., Gullotta, F., Lattanzi, G., D'Apice, M.R., Capanni, C., Nardone, A.M., Columbaro, M., Scarano, G., Mattioli, E., Sabatelli, P. *et al.* (2005) Alterations of nuclear envelope and chromatin organization in mandibuloacral dysplasia, a rare form of laminopathy. *Physiol Genomics,* **23,** 150-8.
[37] Bergo, M. O., Gavino, B., Ross, J., Schmidt, W. K., Hong, C., Kendall, L. V., Mohr, A., Meta, M., Genant, H., Jiang, Y. et al. (2002). Zmpste24 deficiency in mice causes spontaneous bone fractures, muscle weakness, and a prelamin A processing defect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13049-54.
[38]. Lattanzi, G., Columbaro, M., Mattioli, E., Cenni, V., Camozzi, D., Wehnert, M., Santi, S., Riccio, M., Del Coco, R., Maraldi, N.M. *et al.* (2007) Pre-Lamin A processing is linked to heterochromatin organization. *J Cell Biochem,* **102,** 1149-59.
[39]. Pujol G, Söderqvist H, Radu A. (2002)Age-associated reduction of nuclear protein import in human fibroblasts.*Biochem Biophys Res Commun*. **294(2)**:354-8.
[40]. Hirano M, Furiya Y, Asai H, Yasui A, Ueno S. (2006) ALADINI482S causes selective failure of nuclear protein import and hypersensitivity to oxidative stress in triple A syndrome.*Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**,298-303
[41] Scaffidi P, Misteli T. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. Science. 2006 May 19;312(5776):
[42]. D'Angelo MA, Raices M, Panowski SH, Hetzer MW. (2009) Age-dependent deterioration of nuclear pore complexes causes a loss of nuclear integrity in postmitotic cells.*Cell.* **136**, 84-95.

[43] Pan, Y., Garg, A. and Agarwal, A.K. (2007) Mislocalization of prelamin A Tyr646Phe mutant to the nuclear pore complex in human embryonic kidney 293 cells. *Biochem Biophys Res Commun,* **355,** 78-84.
[44] 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. Mol Neurobiol. 2014 Jun;49(3):1200-11

Table 1 : Investigations of radiosensitivity and X-rays-induced DNA repair and signalling in human HGPS fibroblasts

References	Molecular and cellular endpoint investigated	Stress type	Cell lines	Conclusions
(Weichselbaum et al., 1980)	*Intrinsic radiosensitivity*	2-8 Gy X-rays	7 cell lines incl. AG1972	D_0 between 0.96 and 1.39 Gy^{-1a}
(Arlett and Harcourt, 1980)	*Intrinsic radiosensitivity*	1-10 Gy γ-rays Co^{60}	1 cell line (PRO1PV)	$D_0 = 0.96$ Gy^{-1a}
(Epstein et al., 1973)	*SSB repair and signalling*	100 Gy γ-rays Co^{60}	1 cell line (KH)	SSB repair 3-4 times slower in HGPS cells
(Little et al., 1975)	*SSB repair and signalling*	100 Gy γ-rays Co^{60}	6 cell lines	Wide spectrum of responses. Normal repair was seen in SV40-transformed progeric fibroblasts.
	DSB repair and signalling			
(Liu et al., 2005)	γ-H2AX and 53BP1 foci	5 Gy γ-rays+ 10min-12 h	1 cell line (AG11513A)	Abnormal early colocalization between 53BP1 and pH2AX and persistence of foci after 12 h
	RAD51 foci	5 Gy γ-rays+ 10min-24 h	1 cell line (AG11513A)	Less RAD51 foci after 2 and 6 h
(Liu et al., 2006)	ATM, ATR localization	no stress	1 cell line (AG11513A)	Impaired localization and foci pattern
	Phosphorylation of p53, CHK2, Chk1, γ-H2AX	no stress	1 cell line (AG11513A)	Impaired phosphorylation
(Liu et al., 2008)	rad50 and γ-H2AX	no stress	1 cell line (AG11513A)	impaired co-localizations in HGPS cells
	rad51 and γ-H2AX	no stress	1 cell line (AG11513A)	impaired co-localizations in HGPS cells
	XPA and γ-H2AX	no stress	1 cell line (AG11513A)	impaired co-localizations in HGPS cells
	XPC and γ-H2AX	no stress	1 cell line (AG11513A)	impaired co-localizations in HGPS cells
	XPA and γ-H2AX	4 μM camptothecin	1 cell line (AG11513A)	impaired co-localizations in HGPS cells
(di Masi et al., 2008)	p-ATM	2 Gy X-rays + 30 min	1 cell line (MADA)	Nuclear foci in untreated MADA cells
	γ-H2AX	1 Gy X-rays + 30min-24 h	1 cell line (MADA)	Less foci after 30 min but more after 24 h
	p-p53 (western blot)	4 Gy X-rays + 2 h	1 cell line (MADA)	No change after X-rays but phosphorylated levels higher than in controls
(Varela et al., 2008)	γ-H2AX foci	2 Gy X-rays 10 min-24 h w/o ZoPra treatment	1 cell line (AG1972)	Impaired γ-H2AX kinetics partially rescued by the ZoPra treatment
This study	γ-H2AX foci	2 Gy X-rays 10 min-24 h	1 cell line (AG1972)	Spontaneous DSBs but no recognized induced DSBs
	p-ATM foci	2 Gy X-rays 10 min-24 h	1 cell line (AG1972)	Early inhibition of ATM kinase
	p-DNA-PK foci	2 Gy X-rays 10 min-24 h	1 cell line (AG1972)	Early inhibition of DNA-PK kinase
	MRE11 foci	2 Gy X-rays 10 min-24 h	1 cell line (AG1972)	Abnormal activation of MRE11
	p-CHK2 foci	2 and 15 Gy X-rays 4 h w/o ZoPra treatment	1 cell line (AG1972)	Inhibition of CHK2 phosphorylation Differential rescue after ZoPra treatment

Table 2: maximal quantity of nuclear pATM (ng/million of cells) assessed by an ELISA assay for the control cell li HGPS cells.

	Control	HGPS cells
maximal quantity of nuclear pATM (ng/million cells)	2.06	0.26
SEM[1]	0.26	0.04

[1]SEM: Standard Error of the Mean of the two independant replicates

LEGEND TO FIG.S

Fig. 1: The ZoPra treatment restores chromatin condensation in HGPS cells.

Chromatin decondensation, can be partially restored by the reduction of farnesylation of progerin. Spontaneous HP1α foci (green) in untreated or treated HGPS and 1BR3 cells. Scale bars represent 2μm.

Fig. 2: γ-H2AX foci in HGPS fibroblasts. The HGPS (open circles) and 1BR3 (closed squares) fibroblasts were submitted to the ZoPra treatment (right panel) or not (left panel) and thereafter exposed at 2 Gy X-rays following the indicated times for repair. The resulting number of γ-H2AX foci was plotted against repair times. Each plot represents the mean ± standard error of at least three replicates. Upper panel shows some representative γ-H2AX - and DAPI-stained nuclei after 24 h for repair. Scale bars represent 2 μm.

Fig. 3 : Correlation between the surviving fraction at 2 Gy (SF2) and the corresponding percentage of γ-H2AX foci remaining 24 h after 2 Gy. The closed circles represent the different human fibroblast cell lines whose survival and DSB repair data were published elsewhere (Joubert et al., 2008). Notably, AT5BI and 180BR are ATM- and LIG4-mutated cell lines that show hyper-radiosensitivity (Joubert et al., 2008). Open squares are data from the radioresistant CHO-K1 and hyper-radiosensitive CHO-xrs5 rodent cell lines (Joubert et al., 2008). The corresponding survival data from (Weichselbaum et al., 1980) and DSB data shown in fig. 2 of AG01972 HGPS cell line were included (mean ± SEM of N=3 replicates) (open circle). Cellular radiosensitivity (SF2dp) was found to be inversely proportional to the corresponding percentage of γ-H2AX foci remaining at 24 h

post-irradiation (SF2dp = 100 / (γ-H2AX$_{24\ h}$ + 1) - 1; r = 0.76; p<0.03) (solid line (Joubert et al., 2008). To add the HGPS fibroblasts data does not affect significantly the formula (r = 0.77). Arrow indicates the change in DSB data induced by the Zopra treatment.

Fig. 4: ATM kinase activity in HGPS fibroblasts. The HGPS (open circles) and 1BR3 (closed squares) fibroblasts were submitted to the ZoPra treatment (right panel) or not (left panel) and thereafter exposed at 2 Gy X-rays following the indicated times for repair. The resulting number of pATM foci was plotted against repair times. Each plot represents the mean ± standard error of at least two replicates. Upper panel shows some representative pATM- and DAPI-stained nuclei after the 10 min for repair. For convenience the magnification of the photos has been deliberately changed to better observe cytoplasmic and nuclear forms but all the scale bars represent 5 μm.

Fig. 5: DNA-PK kinase activity in HGPS fibroblasts. The HGPS (open circles) and 1BR3 (closed squares) fibroblasts were submitted to the ZoPra treatment (right panel) or not (left panel) and thereafter exposed at 2 Gy X-rays following the indicated times for repair. The resulting number of pDNA-PK foci was plotted against repair times. Each plot represents the mean ± standard error of at least three replicates. Upper panel shows some representative pDNA-PK- and DAPI-stained nuclei after 10 min for repair. Scale bars represent 2 μm.

Fig. 6: MRE11 foci in HGPS fibroblasts. The HGPS (open circles) and 1BR3 (closed squares) fibroblasts were submitted to the ZoPra treatment (right panel) or not (left panel) and thereafter exposed at 2 Gy X-rays following the indicated times for repair. The resulting number of MRE11

foci was plotted against repair times. Each plot represents the mean ± standard error of at least three replicates. Upper panel shows some representative MRE11- and DAPI-stained nuclei after 4 h for repair. Scale bars represent 2 μm.

Fig. 7: CHK2 phosphorylation in HGSP fibroblasts. Representative pCHK2- and DAPI-stained nuclei after the 15 Gy followed by 4 h for repair in HGPS and 1BR3 fibroblasts, treated or not with the ZoPra treatment. Scale bars represent 2 μm.

Fig. 8: A tentative model describing defects in DNA repair in HGPS cells. In normal cells, ATM translocates into the nucleus via the Nuclear Pores Complex (NPC) anchored in Nuclear Enveloppe (NE) and phosphorylates H2AX, to activate DNA-PK and to phosphorylate downstream substrates such as CHK2 and BRCA1. In HGPS cells, progerin prevents the nucleo-shuttling of the ATM forms. An abnormally low amount of nuclear activated ATM kinase molecules does not permit a complete recognition of DSB and a normal DNA damage signalling.

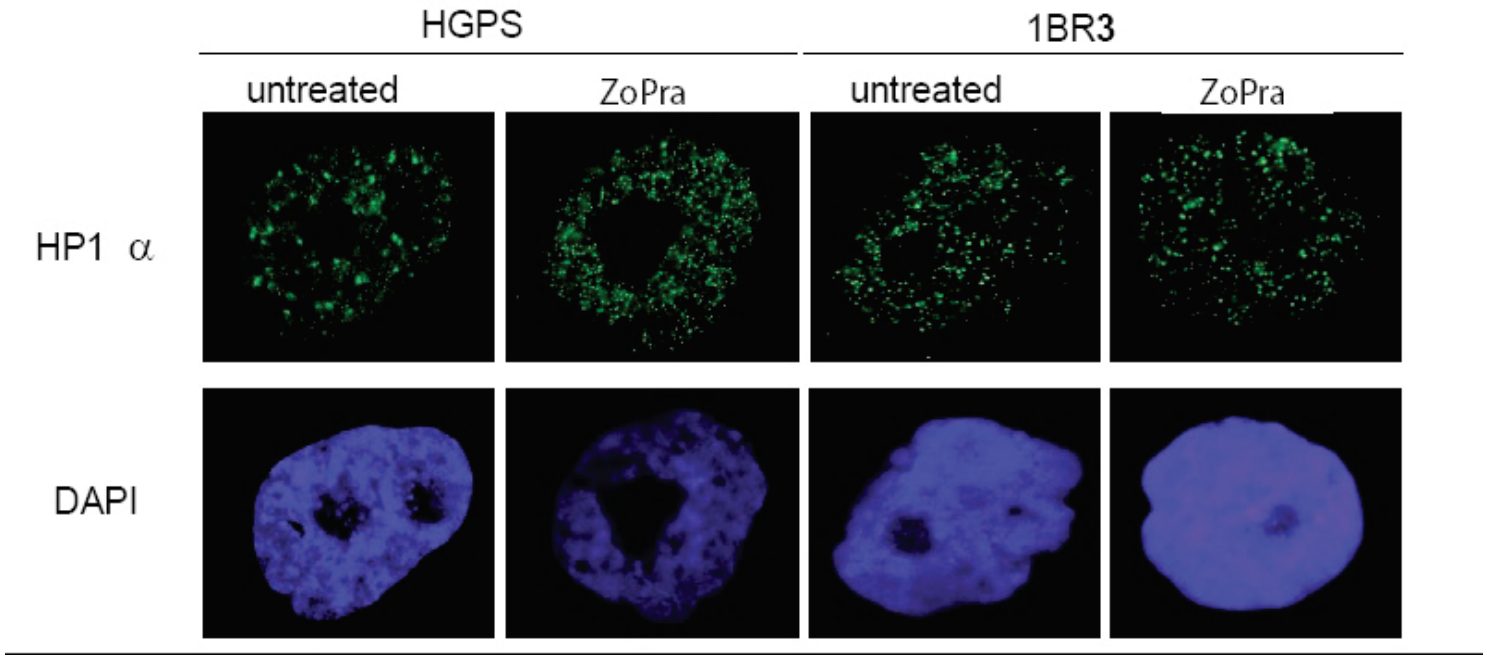


Fig 1

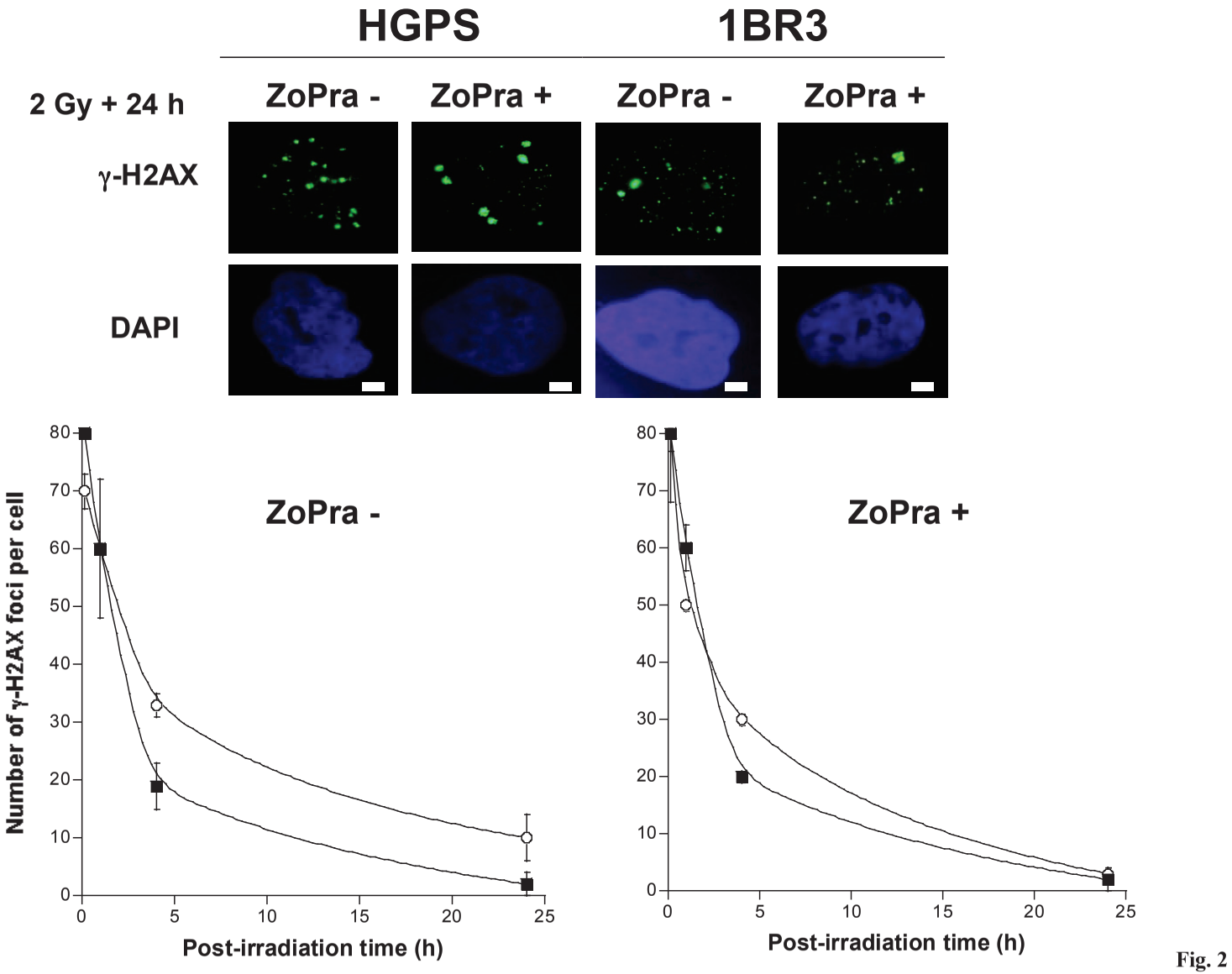

HGPS
1BR3
2 Gy + 24 h
ZoPra -
ZoPra +
ZoPra -
ZoPra +
γ-H2AX
DAPI
ZoPra -
ZoPra +
Number of γ-H2AX foci per cell
Post-irradiation time (h)
Post-irradiation time (h)

Fig. 2

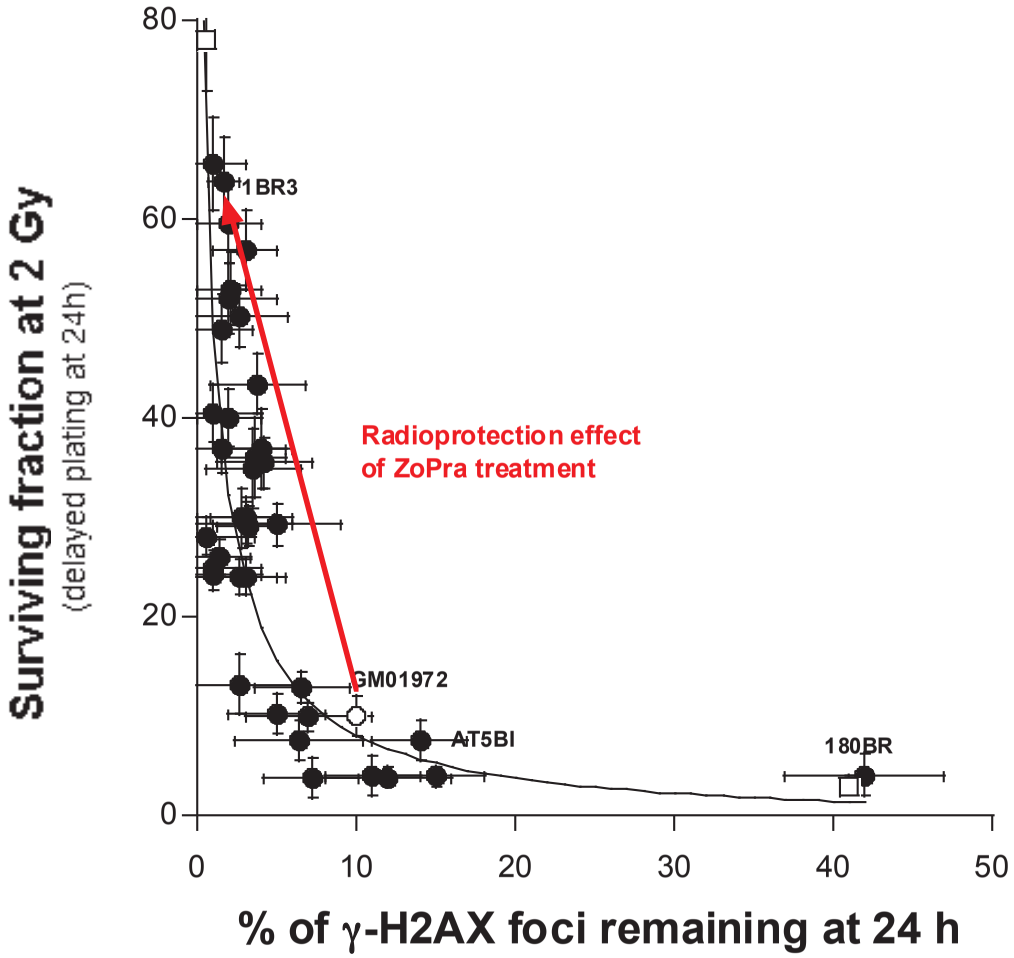

Surviving fraction at 2 Gy
(delayed plating at 24h)
80
60
40
20
0
1BR3
Radioprotection effect
of ZoPra treatment
GM01972
AT5BI
180BR
0
10
20
30
40
50
% of γ-H2AX foci remaining at 24 h

Fig 3

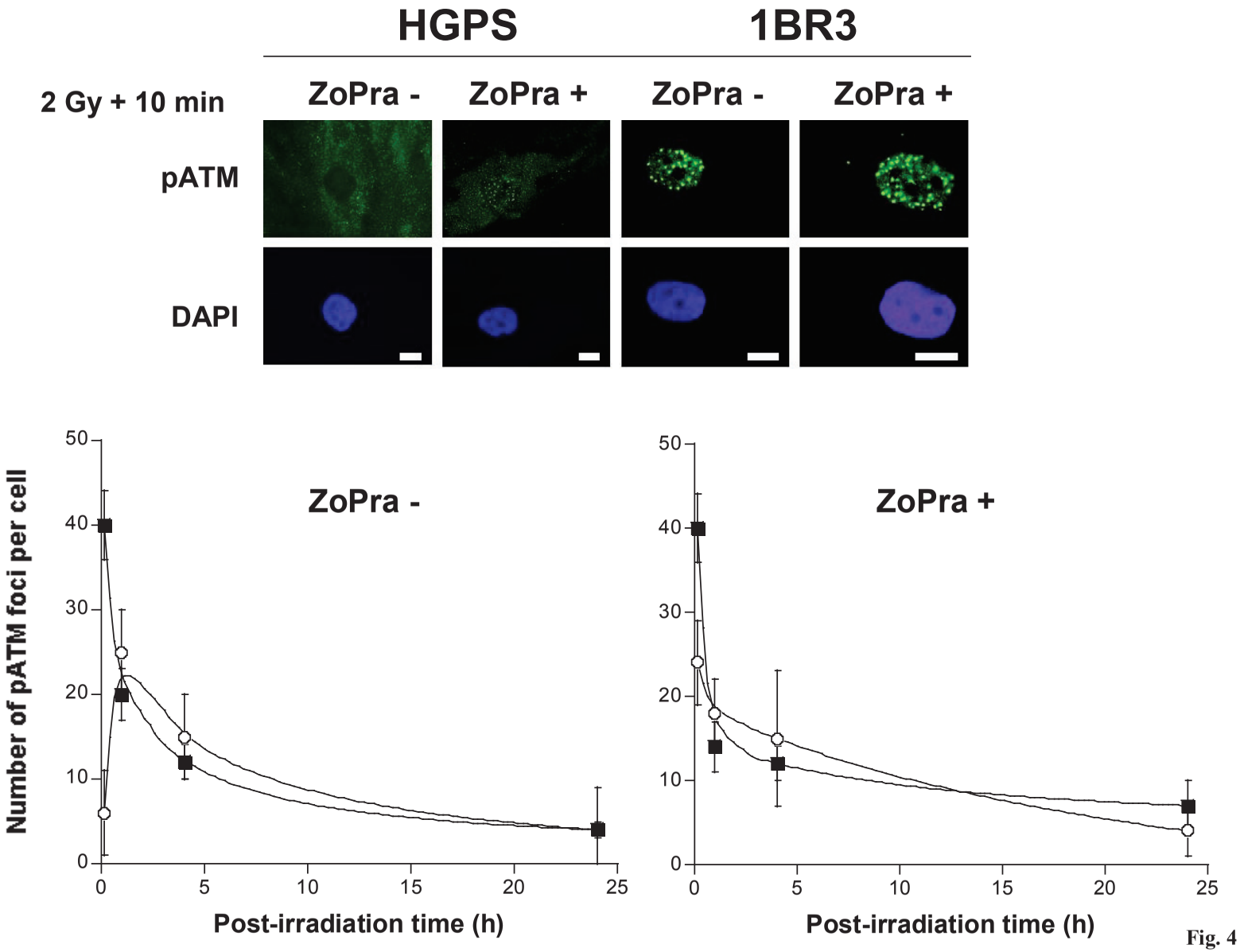

HGPS
1BR3
2 Gy + 10 min
ZoPra -
ZoPra +
ZoPra -
ZoPra +
pATM
DAPI
ZoPra -
ZoPra +
Number of pATM foci per cell
Post-irradiation time (h)
Post-irradiation time (h)

Fig. 4

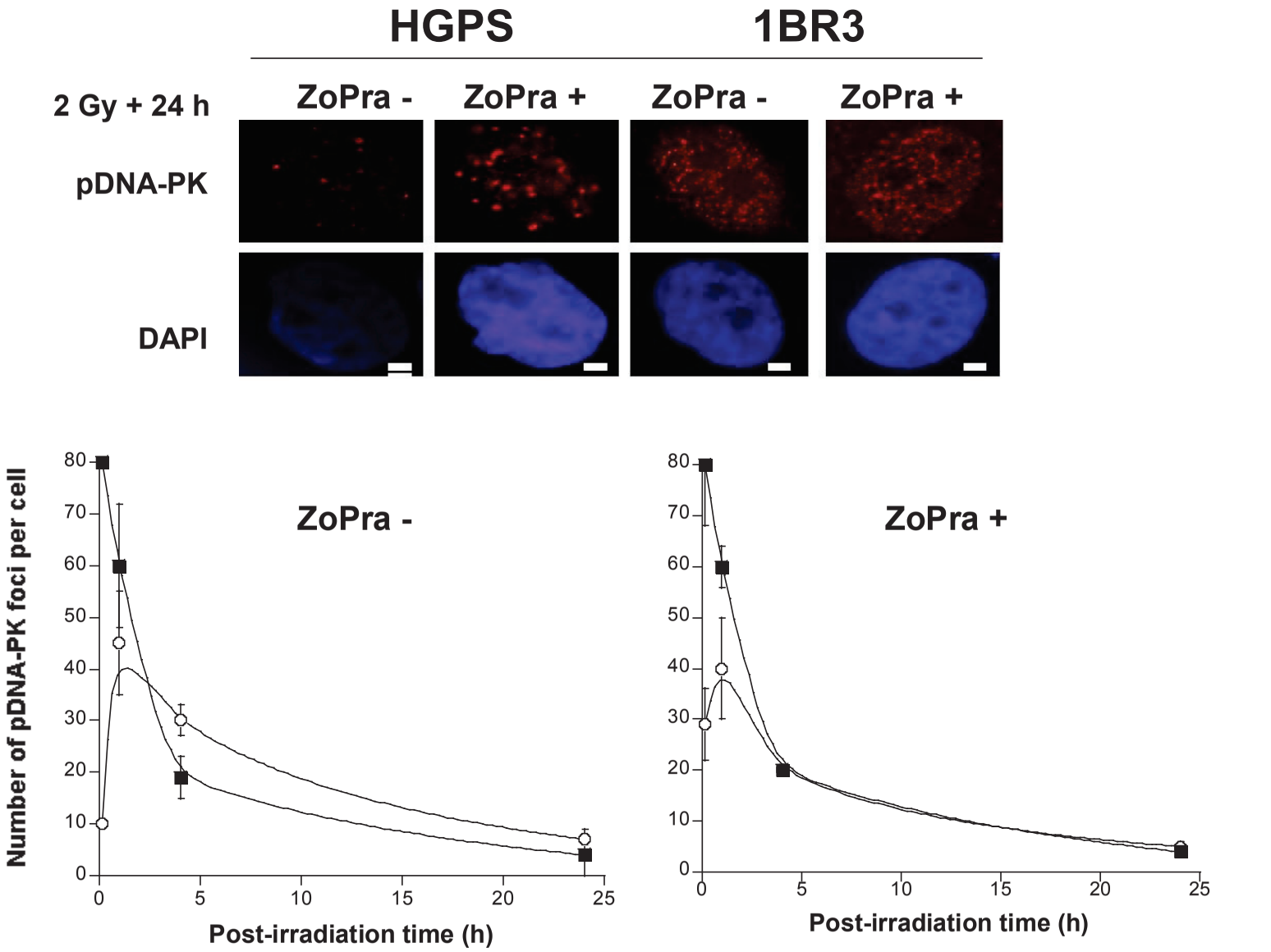

HGPS
1BR3
2 Gy + 24 h
ZoPra -
ZoPra +
ZoPra -
ZoPra +
pDNA-PK
DAPI
Number of pDNA-PK foci per cell
ZoPra -
ZoPra +
Post-irradiation time (h)
Post-irradiation time (h)

Fig. 5

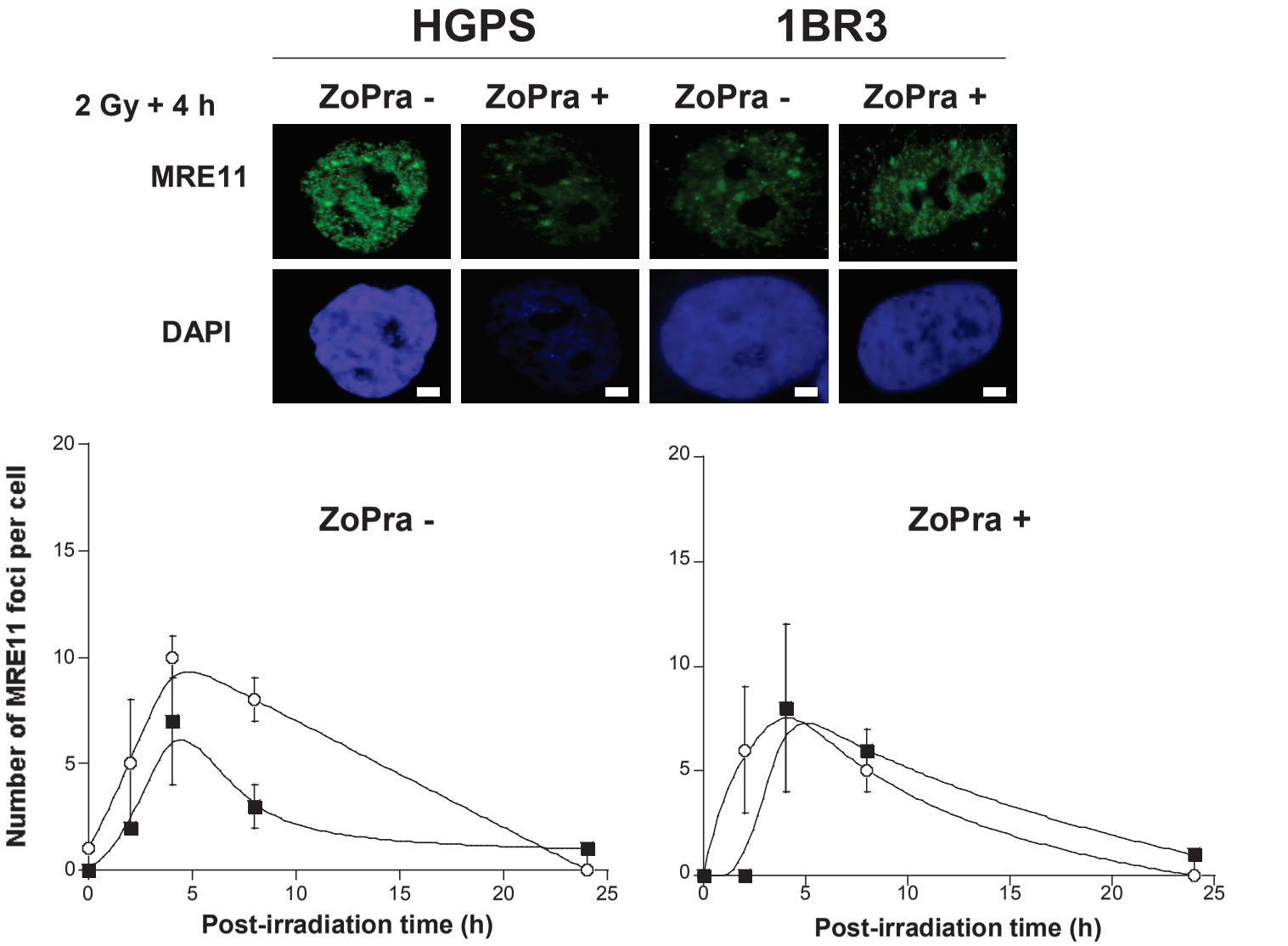

HGPS
1BR3
2 Gy + 4 h
ZoPra -
ZoPra +
ZoPra -
ZoPra +
MRE11
DAPI
ZoPra -
ZoPra +
Number of MRE11 foci per cell
Post-irradiation time (h)
Post-irradiation time (h)
0
5
10
15
20
25

Fig. 6

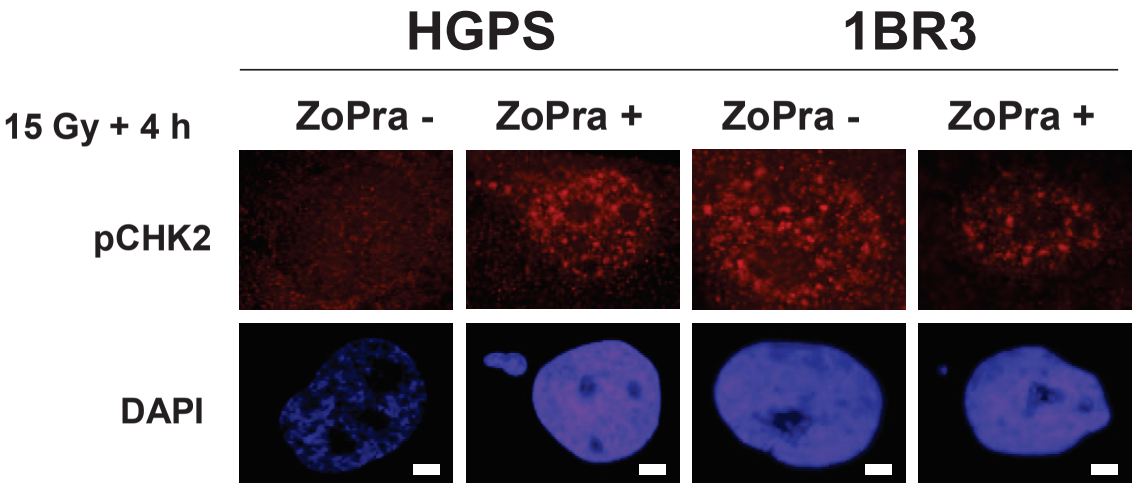


Fig. 7

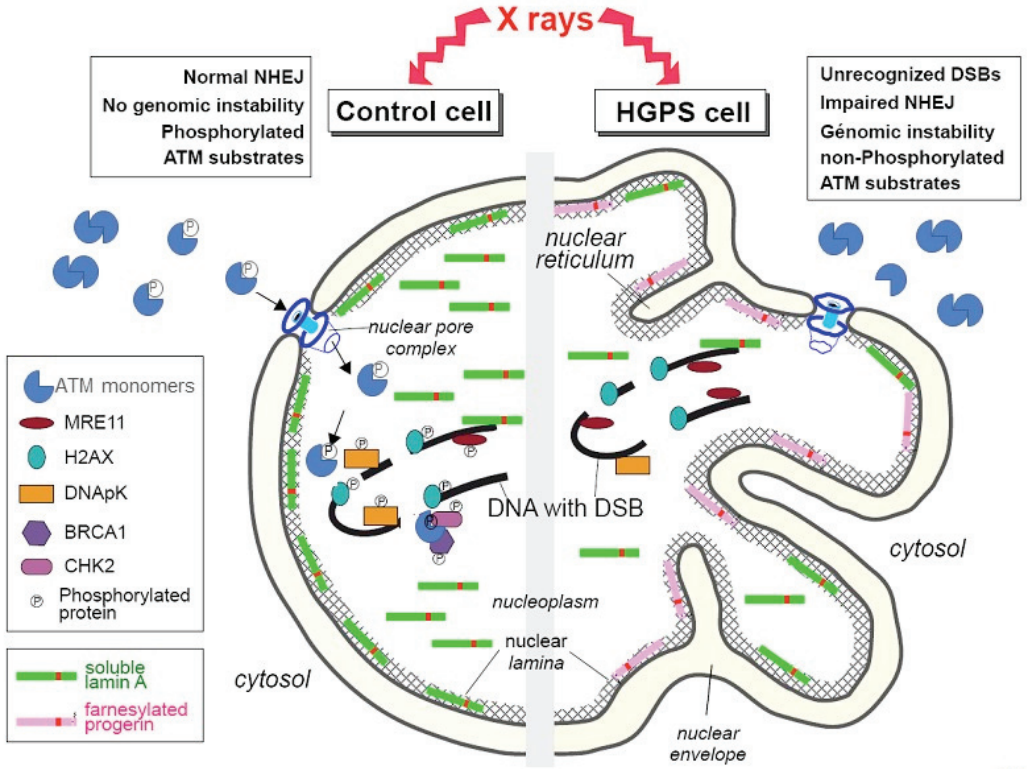

X rays
Normal NHEJ
No genomic instability
Phosphorylated
ATM substrates
Control cell
HGPS cell
Unrecognized DSBs
Impaired NHEJ
Génomic instability
non-Phosphorylated
ATM substrates
nuclear reticulum
nuclear pore complex
ATM monomers
MRE11
H2AX
DNApK
BRCA1
CHK2
Phosphorylated protein
soluble lamin A
farnesylated progerin
DNA with DSB
cytosol
nucleoplasm
nuclear lamina
cytosol
nuclear envelope

Fig.8

ARTICLE VI

DNA double-strand breaks induced by 10 different metals in human cells: influence of the nucleo-shuttling of ATM

Muriel Viau*[1], Laurène Sonzogni[1]*, Mélanie L. Ferlazzo*, Sandrine Pereira[1], Larry Bodgi[1], Adeline Granzotto[1], Clément Devic[1], Robert Barouki[2], Laurent Charlet[2] and Nicolas Foray[1*]

[1]*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1052, Groupe de Radiobiologie, 69008 Lyon, France ;*

[2]

*These authors have contributed equally to this work.

Pages: 22 and

Tables: 1

Figures : 8

Keywords : metal toxicity, DSB repair, ATM

Indexing phrase : ATM nucleoshuttling and DNA breaks induced by metals

[#]Author for correspondence: Dr. Nicolas Foray

INSERM UMR 1052 - Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon

Groupe de Radiobiologie - Bât Cheney A - 28 Rue Laennec 69008 LYON FRANCE

ABSTRACT

Despite a considerable amount of data, the molecular and cellular bases of the toxicity due to contamination with metals remain misknown. Recent mechanistic models from radiobiology emerge by pointing out that the nucleo-shuttling of the ATM protein conditions the recognition and the repair DNA double-strand breaks (DSBs) and the final response to stress. In order to investigate the role of the ATM-dependent DSB repair and signalling, we applied 13 different metal species representing 10 elements (Al, Cu, Zn Ni, Pd, Cd, Pb, Cr, Se and Fe) to human skin, mammary and brain cells. Our findings are in agreement that metals may induce directly or indirectly DSB at a rate that depends on the metal concentration and the tissue type. Furthermore, at specific concentrations, metals may delay the nucleo-shuttling of ATM which impairs DSB repair and contribute to toxicity. A general mechanistic model for the biological action of metal is proposed.

INTRODUCTION

Metals are abundantly used in a number of industrial activities such as mining, metallurgy, production of fertilizers, paints, batteries and, more recently, high-tech products. A number of accidental exposures to metal have increased our knowledge about their toxicity. This is notably the case of saturnism with lead (Pb) (IARC, 2006) and the Itai-Itai disease with cadmium (Cd) (Bertin and Averbeck, 2006; IARC, 1993). Aluminium (Al) and iron (Fe) are incriminated in Alzheimer disease (Drago *et al.*, 2008). Copper (Cu) and Fe have been cited for their potential link to Parkinson disease (Boll *et al.*, 2008). In addition to toxic effects, accidental and/or chronic exposure to metals may also increase cancer risk. For example, epidemiological studies of workers in chromium (Cr) production and of occupational and environmental exposure to arsenic (As) and nickel (Ni) demonstrate the link with lung and nasal cancers (Wild *et al.*, 2009). Metals represent therefore an actual problem of public health throughout two major features: *toxicity* and *cancer risk*. However, despite a considerable number of data, the molecular and cellular bases of the metal-induced (MI) toxicity and/or carcinogenesis of metals remain misknown.

Interestingly, the great majority of studies about MI biological effects have focused on oxidative stress (*i.e.* base damage (BDs) and/or DNA single-strand breaks (SSBs)) while there is still no clear *causal and quantified* link between these DNA damage and cell death or cell transformation (Gastaldo *et al.*, 2007; IARC, 1993; IARC, 2006; Viau *et al.*, 2008). By contrast, studies about the biological effects of ionizing radiation, another toxic and carcinogen agent, provide increasing evidence of *causal and quantified* link between toxicity and *unrepaired* DNA double-strand breaks (DSBs) on one hand, and between genomic instability and *misrepaired* DSBs on another hand (Foray *et al.*, 2016; Joubert *et al.*, 2008). The MI stress was longer considered to be too energetically low to produce numerous DSB directly. However, Fenton-like reactions and genetic impairments in the DSB repair pathways may cause direct or indirect production of DSB in response to metal exposure (IARC, 1993; IARC, 2006).

In quiescent mammalian cells, the DSB repair is mainly insured by the non-homologous end-joining (NHEJ) pathway whose the phosphorylation of the variant H2AX histone proteins (γH2AX) is the earliest sensor (Rothkamm and Lobrich, 2003). Recently, the rate of the radiation-induced (RI) nucleo-shuttling of the ATM protein, a major actor of DSB repair and signalling, was found to be a reliable predictor of radiosensitivity. The following mechanistic model was proposed: RI oxidization triggers the monomerization of the cytoplasmic ATM dimers, which allows the ATM monomers to diffuse in the nucleus. Once in nucleus, the ATM monomers phosphorylate H2AX histones which triggers DSB (Bodgi and Foray, 2016; Granzotto *et al.*, 2016).

Here, we examined whether the theory of the ATM nucleo-shuttling is also relevant for the genotoxic stress caused by metals. Human cells from different genetic status and origin were exposed to 13 different metallic species (representing 8 different metals) and subjected to immunofluorescence with the major endpoints of the theory of the ATM nucleo-shuttling.

MATERIALS AND METHODS

Metals

All the indicated metal species tested in this study ($AlCl_3$, $CuCl_2$, $CuSO_4$, $ZnCl_2$, $NiCl_2$, $PdCl_2$, $CdCl_2$, $Cd(CH_3CO_2)_2$, $C_{12}H_{10}Cd_3O_{14}$, $Pb(NO_3)_2$, Na_2CrO_4, Na_2SeO_3 and $FeCl_3$) were purchased from (Sigma-Aldrich France, Saint-Quentin-Fallavier, France). Metals were diluted into culture medium for 24 h. If cells are irradiated, the culture medium was renewed without metal.

Cell lines

For the first steps of the study, untransformed human fibroblast cell lines were used for their genomic stability and to avoid any confounding effect of immortalization. Cells were routinely cultured as monolayers with Dulbecco's modified Eagle's minimum medium (DMEM) (Gibco-Invitrogen-France, Cergy-Pontoise, France), supplemented with 20% fetal calf serum, penicillin and streptomycin. All the experiments were performed with cells in plateau phase of growth (95 - 99 % in G0/G1) to overcome any cell cycle effects. The origin and the radiobiological features of the radioresistant control 149BR were published elsewhere (Foray *et al.*, 1996; Foray *et al.*, 1997). The human mammary endothelial HMEC cells (purchased from Gibco) were routinely cultured as monolayers with RPMI medium (Gibco), supplemented with 20% fetal calf serum, penicillin and streptomycin (Gastaldo *et al.*, 2011). The human spinal cord (Hasp), cortex (Ha) and hippocampus (Hah) were purchased from ScienCell Research Laboratories (Carlsbad, CA, USA) and routinely cultured as monolayers with specific culture medium provided by the manufacturer. It is noteworthy that the concentrations of the metal species tested in this study are much higher than those of these culture mediums.

Irradiations

An X-rays clinical irradiator devoted to research was used to perform all the irradiations. The X-rays beam was produced from a tungsten anode, applying a voltage setting of 200 kV, an intensity of 20 mA and using a filtration of 0.1 mm copper filter. The dose-rate was 1.234 $Gy.min^{-1}$ (Foray *et al.*, 1996; Foray *et al.*, 1997).

Immunofluorescence

Immunofluorescence protocol was described elsewhere (Foray *et al.*, 2003). Briefly, cells were fixed in paraformaldehyde for 10 min at room temperature and were permeabilized in 0.5% Triton X-100 solution for 5 min at 4°C. Primary and secondary antibody incubations were performed for 40 and 20 min at 37°C, respectively. Anti-$\gamma H2AX^{ser139}$ antibody (#05636; Upstate Biotechnology-Euromedex, Mundolsheim, France) was used at 1:800. The monoclonal anti-mouse anti-$pATM^{ser1981}$ (#ab2888) from Abcam (Cambridge, UK) was used at 1:100. Incubations with anti-mouse fluorescein (FITC) and rhodamine (TRITC) secondary antibodies were performed at 1:100 at 37°C for 20 min. Slides were mounted in 4',6' Diamidino-2-Phényl-indole (DAPI)-stained Vectashield (Abcys, Paris, France) for scoring micronuclei an dmitoses and examined with Olympus fluorescence microscope. DAPI staining permitted also to indirectly evaluate yield of G_1 cells (nuclei with homogeneous DAPI staining), S cells (nuclei showing numerous γH2AX foci), G_2 cells (nuclei with heterogeneous DAPI staining) and metaphase (visible chromosomes).

Statistical analysis

The immunofluorescence data were fitted to the so-called Bodgi's formula that describes the kinetics of appearance/disappearance of nuclear foci formed by some protein relocalizing after genotoxic stress (Bodgi *et al.*, 2013). Briefly, the number of nuclear foci N(t), at a given dose D and a post-irradiation time t is given by :

$$N(t) = ID\left(1 - \frac{1}{1 + b_{rec}t}\right)^{a_{rec}}\left(\frac{1}{1 + b_{rep}(t - t_0)}\right)^{a_{rep}}$$

In which: I is the induced number of foci per Gy; a_{rec} and b_{rec} are the recognition rate parameters; a_{rep} and b_{rep} are the repair rate parameters and t_0 represents the delay between the recognition and the repair process. Statistical analysis was performed by using Kaleidagraph v4 (Synergy Software, Reading, PA, USA).

RESULTS

Unrepaired MI-DSB assessed with different endpoints

In order to assess the number of unrepaired MI-DSB, anti-γH2AX immunofluorescence was applied to human fibroblast cells after a metal contamination for 24 h. The resulting MI-response curves elicited similar shapes, suggesting that the number of unrepaired MI-DSB obeys a sigmoidal function of the metal concentration (Figure 2). In our hands, all the numbers of residual γH2AX foci higher than 2 per cell are considered to be associated with a significant biological effect (Bodgi and Foray, 2016; Granzotto *et al.*, 2016). The threshold metal concentration to reach this numerical value was deduced from our data and found to be strongly dependent of the metal species (Table 1). For most of the metal species tested, two parts of the MI-response curves were observed (Figure 2):

- A metal concentration range in which the number of γH2AX foci is not significant or increases very slowly with metal concentration
- A metal concentration range in which the number of γH2AX foci becomes significant and/or brutally increases
- at the metal concentrations tested, no saturation plateau phase was found, as generally observed in sigmoidal curves.

All the metal species tested here are characterized by a threshold metal concentration in the µM range or in the nM range (for Na_2CrO_4 only) (Table 1). Altogether, the data suggest that the metal species tested here can induce severe DSB, whether directly or indirectly. In the same conditions, we investigated other endpoints generally associated with severe DSB such as the yields of micronuclei and highly damage cells (HDC).

Micronuclei are considered as the cytogenetic reflect of the unrepaired DSB propagated to mitotic phase (Grote *et al.*, 1981). The MI-micronuclei response curves of the other metal species generally obeyed a pseudo linear dose-function with a specific rate (Figure 2A). In agreement with the γH2AX data, the MI-micronuclei curves of Na_2CrO_4 appeared again shifted to the nM range. Interestingly, some metal species like $Pb(NO_3)_2$ and $CuSO_4$ also showed a drastic decrease of the

number of micronuclei at high concentration. At this stage, we can evoke the possibility that the process of micronuclei is so rapid that a large number of them escape from cells (exocytosis phase) and are lost during the immunofluorescence procedure. By plotting the γH2AX data against the corresponding micronuclei ones, a quantitative link appeared between the two endpoints: the higher the number of the γH2AX foci, the higher the yield of micronuclei with metal specie-specific linear slopes (Figure 2B). With pooled data, the average linear slope was 1.17 ± γH2AX foci per 0.01 micronuclei (see below). $PdCl_2$ elicited the highest γH2AX/micronuclei slope (Figure 2B).

HDC are generally observed after a cancer-prone hyper-recombination process (Colin *et al.*, 2011). The MI-HDC curves are very similar to the γH2AX ones, suggesting a strong metal concentration-dependence for producing HDC (Figure 2C). It is however noteworthy that the Cu species showed very high (70 to 90%) proportion of HDC cells. The link between the γH2AX and HDC was also found linear in the great majority of metal species tested (the higher the number of residual γH2AX foci, the higher the yield of HDC). $CuCl_2$ and $NiCl_2$ elicited the highest γH2AX/HDC slopes (Figure 2D).

Some authors have reported that low metal concentrations may stimulate cellular proliferation which would favor mitosis and therefore micronuclei formation. Although 95-99% exposed cells are in plateau phase of growth, it is possible that few % cells overcome mitosis in response to metal contamination. To verify this hypothesis, we examined the number of mitoses per 100 cells in the same conditions as described above. For all the metal species tested, we observed more than 2 mitoses per 100 cells and this number decreased as far as the metal concentration increased suggesting that high concentrations of metal trigger cell cycle arrest. However, for certain metal species and certain low concentrations of metal, the number of mitoses can increase or describes non-linear effects whose biological interpretation remains to be provided.

Influence of the presence of metal during RI-DSB recognition and repair

The data described above showed that metal contamination induces a relatively low number of DSB at concentrations lower than 100 µM. Hence, such data did not permit to verify whether metal inhibits the recognition and the repair of the DSB that it induces. As already applied in previous studies (Gastaldo, Viau, Bencokova, Joubert, Charvet, Balosso and Foray, 2007; Viau, Gastaldo, Z., Joubert and Foray, 2008) , we used X-rays-irradiation to increase the number of DSB without any chemical interaction with metal. The advantage of this technique is that the RI-DSB induction rate (in our conditions, 37 ± 4 DSB per Gy per cell) and the RI-DSB repair kinetic of the cell lines tested here are very well documented Hence, cells were exposed to metals for 24 h, then exposed to 2 Gy X-rays (for 2 min). After culture medium renewal, a post-irradiation repair time ranging from 10 min to 24 h was applied thereafter (Figure 3A,B). The resulting DSB repair kinetics elicited a shape of curves similar to that of cells irradiated without metal, to the notable exception of:

- the 10 min-1h data points, showing an eventual decrease of the number of γH2AX foci, interpreted as a lack of DSB recognition by the NHEJ pathway
- the 24 h data points, showing an eventual significant number of residual γH2AX foci, interpreted as a DSB repair defect by the NHEJ pathway (Bodgi and Foray, 2016; Granzotto *et al.*, 2016).

The great majority of the resulting data suggested that the presence of metal may affect DSB recognition and/or and repair. However, the quantitative impact on these two steps was found strongly dependent of the metal considered and the concentration tested. For example, by comparing the number of γH2AX foci assessed at 10 min post-irradiation tested with those obtained without metal contamination, it appeared that 100 µM $Pb(NO_3)_2$, 100 µM $NiCl_2$, or 1 µM Na2CrO4 drastically impairs the RI-DSB recognition (Figure 3C). Similarly, by plotting the numbers of γH2AX foci obtained after 24 h post-irradiation and the corresponding data obtained without irradiation, Figure 3D revealed strong RI-DSB repair defects in agreement with data shown in Figures 3A and B. Besides, a one-to-one correlation was found between the number of unrepaired

DSB after a metallic contamination with and without irradiation (y= - 3.68 + 1.15x; r=0.95) (Figure 3D). It is noteworthy than the non-nil intercept of about 3 γH2AX foci observed with X-rays treatment may correspond to the number of residual γH2AX foci generally assessed with the cell line tested after 2 Gy X-rays without metal contamination (the number of spontaneous γH2AX foci is not significant, data not shown). Altogether, these data suggest that our approach of X-irradiation after metal-contamination is an interesting tool for evaluating the impact of the metal on the DSB recognition and repair process, independently of the MI-DSB production one.

Influence of the presence of metal on the nucleo-shuttling of ATM

The data described above suggested that metals inhibit DSB recognition and/or repair via the ATM-dependent NHEJ pathway. In the frame of our theory of the ATM nucleoshuttling, these observations may be explained by the delay in the diffusion of the ATM monomers in nucleus, which is quantifiable by a decrease of the number of the nuclear pATM foci per cell in the first hour post-irradiation (Bodgi and Foray, 2016). By applying anti-pATM immunofluorescence to the contaminated and irradiated cells, the numbers of the nuclear pATM foci assessed 10 min after irradiation were found generally lower than those obtained with non-contaminated cells (Figure 4). Interestingly, when metal species were classified by their capacity of inhibiting DSB recognition, the rank order obtained with pATM and γH2AX data were found not significantly different. Besides, a quantified correlation was also obtained between the two data groups (data not shown). These findings strongly suggest that, together with ionizing radiation, the metals obey the theory of the nucleoshuttling of ATM.

Influence of the tissue-type on the response to metal contamination

The theory of the ATM nucleo-shuttling is in agreement with a response to stress that would be tissue-specific. In fact, the nucleo-shuttling of ATM was found to be strongly dependent of the cytoplasme volume that conditions the mean free path of the ATM molecules to the nucleus. Since

the response to metal species of brain (for neuronal pathologies) and skin cells (for cutaneous contact) is of particular interest, we assessed the number of γH2AX foci and micronuclei remaining after incubation with metal for 24 h in 3 human non-transformed astrocyte cell lines from the same donor. These brain cell lines provided from the cortex (Ha), the hippocampus (Hah), and the spinal cord (Hasp). The skin fibroblast cell line used for the data previously described served as a control. As a first step, $AlCl_3$ was chosen as the metal specie of interest. Similarly to the data described in Figure 1, the numbers of residual γH2AX foci obeyed a pseudo-sigmoidal shape with a threshold concentration to reach more than 2 γH2AX foci that was found specific to cell type. The γH2AX data from skin fibroblast and from the cortex astrocyte Ha cell lines were not different significantly. The threshold concentration to reach more than 2 γH2AX foci was about 100 μM $AlCl_3$ while it was about 240 and 400 μM $AlCl_3$ for the spinal cord Hasp and the hippocampus Hah astrocyte cell lines (Figure 5A). Hence, these data would have suggested that less MI-DSB were induced in the last two brain cell lines than in skin fibroblasts. Surprisingly, when micronuclei yields are considered, the conclusions were different: the cortex astrocyte Ha cell line elicited much more than the two other brain cell lines and the skin fibroblast showed the lowest micronuclei yields (Figure 5B). In order to better understand these findings, we plotted the number of residual γH2AX foci against the corresponding number of micronuclei (Figure 5C): while the skin fibroblast cell line described a linear function between γH2AX foci and micronuclei with a linear slope of about 1 γH2AX foci per 0.01 micronuclei (as detailed above), this slope value became 0.3 for the spinal cord astrocytes (similar to the slope obtained with X-rays) and 0.07 for the two other brain cell lines (Figure 5C), suggesting that for 3 and 14 times more micronuclei for the same number of γH2AX foci. In order to explain such differences, we evoked, in the first section of the Results chapter, the possibility that low metal concentrations can stimulate cell proliferation, which would favor micronuclei formation. An alternative explanation, more compatible with the theory of the nucleoshuttling of ATM, would be to consider that the delay of the ATM nucleo-shuttling is so important that the number of unrecognized MI-DSB increases with the metal concentration. As a

consequence, there is no drastic increase of the number of γH2AX foci since there are less ATM monomers to phosphorylate H2AX at the DSB sites. Conversely, each unrecognized (and therefore unrepaired) DSB is transformed in micronuclei. In addition to a reduced absence of ATM monomers in nucleus, recombination process, an alternative DSB repair pathway can be over-activated and become less controlled : the hyper-recombination process may increase the number of DSB without increasing the number of γH2AX foci. If verified, this phenomenon suggests that anti-γH2AX immunofluorescence may not systematically detect all the unrepaired DSB that participate to toxicity.

The phenomenon of hypersensitivity to low metal concentrations

The phenomenon described above can occur at low metal concentrations, as well. Indeed, this phenomenon called "hypersensitivity to low dose (HRS)" in radiation biology was recently explained at the molecular scale with the theory of the ATM nucleoshuttling (Bodgi and Foray, 2016; Joiner *et al.*, 2001). In fact, if the genotoxic stress is too low, the number of ATM monomers produced in cytoplasm will be reduced and, consequently, the hyper-recombination process may accumulate more DSB. If a long time is allowed post-stress (e.g. 24 h), these additional DSB may be revealed by the ATM-dependent H2AX phosphorylation. Interestingly, by investigated the biological effects of metal contamination in some other cell types, we observed the HRS phenomenon for the human mammary epithelial (HMEC) cell line at 30 µM $AlCl_3$. At this concentration, the number of γH2AX foci was found to be equivalent to that expected at 115 µM $AlCl_3$ (i.e. at a 3.8 times higher concentration) (Figure 6A). This non-linear phenomenon was not observed with radioresistant skin fibroblast cell lines. It may also be visible in a semi-log scale (Figure 6B).

DISCUSSION

The need of a consensual scale to account for toxicity and carcinogenicity of metals

Due to their plethoric applications and their potential toxicity and carcinogenicity, metals, like any chemical agent, are submitted to specific international and national rules for regulating their use and transport. Particularly, the material safety data sheets (MSDS) usefully inform workers and users of the main dangers that they represent. However, the MSDS content can differ drastically from a country to another and illustrates the diversity of the classifications of chemicals. Face to this diversity, international authorities endeavored to get consensual decisions with the redaction of the Globally Harmonized System (GHS). Unfortunately, there is still no simple correspondence between all the categories proposed by the different safety agencies. GHS *categories* do not correspond to the *groups* defined by the International Agency for Research on Cancer (IARC): for example, a chemical classified as IARC Group 2B (possibly carcinogen) could be found into GHS category 1B or category 2 (presumed or suspected carcinogen). In addition to this lack of consensus, none of these classifications permits intercomparisons between the toxic and/or carcinogenic properties of chemical agents belonging to the same categories or group. For example, the IARC Group 1/ GHS Category1A chemicals are more or less aggressive to humans but these classifications have not any quantitative relevance. Altogether, these elements demonstrate the need of a *quantitative and objective* scale to account for toxic and cancer risks but also the necessity of examining a large panel of metal species with the same endpoint. The present study aims to initiate a consensual approach to compare the biological effects of different metals.

Unrepaired DSB as a single unit to account for toxicity of metals?

Impressive advances in radiation biology have contributed to establish *unrepaired* DNA double-strand breaks as a key-endpoint to quantify cellular death (Foray, Bourguignon and Hamada, 2016). By contrast, exposure to metal was longer considered to be too energetically low to produce numerous DSB directly (Hartwig, 1995). However, the present study shows that some metals

applied to different tissues can result in the production of significantly different yields of unrepaired DSB and/or contribute unequally to increase their severity. Hence, it was logical to investigate and compare the fate of RI- and MI-DSB in different types of cells. Unfortunately, the two most extensively used assays for quantifying DSB, namely the γH2AX and the micronuclei assays, did not necessarily provide the same information. Indeed, our data showed limitations of the application of the γH2AX assay to quantify risk and the lack of detectability of micronuclei assay. Interestingly, both γH2AX and micronuclei assays appeared to be not performant enough to discriminate the intermediate response to radiation, suggesting that the yield of unrepaired DSB or residual micronuclei may be not the best molecular endpoints to predict toxicity (Bodgi and Foray, 2016; Granzotto *et al.*, 2016).

The theory of the nucleo-shuttling of ATM is applicable to metals

In order to overcome the problem of the lack of sensitivity of the γH2AX and micronuclei assays and to better understand the intrinsic mechanisms of intermediate response to stress, we systematically applied a number of biomarkers of the DSB repair and signalling pathways to a large collection of human fibroblasts showing a large spectrum of radiation response: three important conclusions were drawn:

- the assessment of the delay of the ATM nucleoshuttling appeared to be more reliable than that of the residual γH2AX foci and micronuclei in the quantification of the lethal effect.
- three groups of radiosensitivity were defined according to the rate of the ATM nucleoshuttling: group I (fast nucleoshuttling, radioresistant, low cancer risk); group II (delayed nucleoshuttling, intermediate radiosensitivity, high cancer risk); group III (gross DSB repair defect, hyper-radiosensitivity, high cancer risk).
- The theory of the ATM nucleoshuttling allowed us to propose, for the first time from the 70s, a biological explanation to the empirical linear-quadratic formula that links the cell survival to the radiation dose (Bodgi and Foray, 2016).

The consequence of this theory is that:

- As far as they are characterized by a specific rate of ATM nucleoshuttling, cell types may show different responses to the same dose or concentration of stress.
- In some specific dose or concentration range, some non-linear effects (such like HRS) may occur, notably with different γH2AX foci/micronuclei ratios.

Human cells were shown to tolerate no more than 2 unrepaired DSB per cell without showing biological and clinical features. For this reason, we quantified, for each metal tested, the threshold concentration to reach 2 unrepaired DSB. Interestingly, by comparing the resulting values with the current recommendations of the World Health Organization (WHO) or the European Union (EU) about the maximal concentrations of metal allowed in tap water, we observed that limits for selenium, cadmium and lead are much below from the threshold concentration to reach 2 unrepaired DSB (Figure 7). Conversely, limits for zinc, nickel and chromium are significantly up to their corresponding threshold concentration. Obviously, further investigations are needed to document the link between the exposure of cells to metal in the culture medium for 24 h and the daily consummation of tap water. However, it must be stressed that the threshold concentration to reach 2 unrepaired DSB were established for radioresistant skin fibroblasts that do not show HRS phenomenon.

Hence, our findings showed coherent and quantitative link between γH2AX foci, pATM foci, micronuclei and HDC cells for all the thirteen metal species tested. Data are in agreement with a delay of the ATM nucleoshuttling that would occur and high concentrations specific to each metal. The HRS phenomenon and the tissue-dependence in the response of metal contamination were observed. Altogether, these findings strongly suggest that the theory of the nucleo-shuttling of ATM is applicable to metals. A general mechanistic model can be proposed (Figure 8): metals that enter into cells create, via Fenton-like reactions, an oxidative stress in cytoplasm, which can trigger ATM monomerization and in nucleus, which can trigger SSB and DSB formation. The rates of ATM monomerization and of formation of DNA damage are different and are strongly dependent on cell

type and metal specie. At a certain threshold concentration of metal, metals may prevent the nucleoshuttling of ATM which render MI-DSB, unrecognized and/or unrepairable via NHEJ: they lead to toxicity and/or carcinogenicity. At low concentration of metals, if the rate of ATM monomerization is too low while the rate of DSB formation is significant, an HRS phenomenon may occur. Lastly, in cells with large cytoplasm, the mean free path of ATM may be longer, which leads to a significant delay in the nucleoshuttling of ATM and influences the response to metal. Altogether, these elements may provide a model of cocktail effects. Indeed, if a metal specie A is a powerful DSB inducer and a metal specie B is a powerful DSB repair inhibiteur, the combination A+B may provide supra-additive biological effect.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Institut National du Cancer (INCA) (GRRAAL Project), he Agence Nationale pour le Recherche (ANR) (HEMI-BREAKS Project) and the the Plan Cancer / AVIESAN grants (BACCHUS Project), the Commissariat General à l'Investissement (Programmes Investissement d'avenir (INDIRA Project), the Cancéropôle Rhône-Alpes (EURIPIDE project) and the Association Pour la Recherche sur l'Ataxie-Telangiectasie (APRAT).

REFERENCES

Au, K. S., Williams, A. T., Roach, E. S., Batchelor, L., Sparagana, S. P., Delgado, M. R., Wheless, J. W., Baumgartner, J. E., Roa, B. B., Wilson, C. M.*, et al.* (2007). Genotype/phenotype correlation in 325 individuals referred for a diagnosis of tuberous sclerosis complex in the United States. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* **9**(2), 88-100.

Badie, C., Iliakis, G., Foray, N., Alsbeih, G., Cedervall, B., Chavaudra, N., Pantelias, G., Arlett, C., and Malaise, E. P. (1995). 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* **144**(1), 26-35.

Bertin, G., and Averbeck, D. (2006). Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* **88**(11), 1549-59.

Bodgi, L., and Foray, N. (2016). The nucleo-shuttling of the ATM protein as a basis for a novel theory of radiation response: resolution of the linear-quadratic model. *International journal of radiation biology* **92**, 117-131.

Bodgi, L., Granzotto, A., Devic, C., Vogin, G., Lesne, A., Bottollier-Depois, J. F., Victor, J. M., Maalouf, M., Fares, G., and Foray, N. (2013). A single formula to describe radiation-induced protein relocalization: towards a mathematical definition of individual radiosensitivity. *Journal of theoretical biology* **333**, 135-45.

Boll, M. C., Alcaraz-Zubeldia, M., Montes, S., and Rios, C. (2008). Free copper, ferroxidase and SOD1 activities, lipid peroxidation and NO(x) content in the CSF. A different marker profile in four neurodegenerative diseases. *Neurochem Res* **33**, 1717-1723.

Colin, C., Devic, C., Noël, A., Rabilloud, M., Zabot, 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.

Drago, D., Bolognin, S., and Zatta, P. (2008). Role of metal ions in the abeta oligomerization in Alzheimer's disease and in other neurological disorders. *Current Alzheimer research* **5**, 500-507.

Ferlazzo, M. L., Sonzogni, L., Granzotto, A., Bodgi, L., Lartin, O., Devic, C., Vogin, G., Pereira, S., and Foray, N. (2014). 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* **49**, 1200-1211.

Foray, N., Bourguignon, M., and Hamada, N. (2016). Individual response to ionizing radiation. *Mutation Research Review* **770**, 369-386.

Foray, N., Fertil, B., Alsbeih, M. G., Badie, C., Chavaudra, N., Iliakis, G., and Malaise, E. P. (1996). Dose-rate effect on radiation-induced DNA double-strand breaks in the human fibroblast HF19 cell line. *International journal of radiation biology* **69**(2), 241-9.

Foray, N., Marot, D., Gabriel, A., Randrianarison, V., Carr, A. M., Perricaudet, M., Ashworth, A., and Jeggo, P. (2003). A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *The EMBO journal* **22**(11), 2860-71.

Foray, N., Priestley, A., Alsbeih, G., Badie, C., Capulas, E. P., Arlett, C. F., and Malaise, E. P. (1997). Hypersensitivity of ataxia telangiectasia fibroblasts to ionizing radiation is associated with a repair deficiency of DNA double-strand breaks. *International journal of radiation biology* **72**(3), 271-83.

Gastaldo, J., Bencokova, Z., Massart, C., Joubert, A., Balosso, J., Charvet, A. M., and Foray, N. (2011). Specific molecular and cellular events induced by irradiated X-ray photoactivatable drugs raise the problem of co-toxicities: particular consequences for anti-cancer synchrotron therapy. *Journal of Synchrotron Radiation* **18**, 456-463.

Gastaldo, J., Viau, M., Bencokova, Z., Joubert, A., Charvet, A. M., Balosso, J., and Foray, N. (2007). Lead contamination results in late and slowly repairable DNA double-strand breaks and impacts upon the ATM-dependent signaling pathways. *Toxicol Lett* **173**(3), 201-14.

Granzotto, A., Benadjaoud, M. A., Vogin, G., Devic, C., Ferlazzo, M. L., Bodgi, L., Pereira, S., Sonzogni, L., Forcheron, F., Viau, M.*, et al.* (2016). Influence of Nucleoshuttling of the ATM Protein in the Healthy Tissues Response to Radiation Therapy: Toward a Molecular Classification of Human Radiosensitivity. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **94**(3), 450-60.
Grote, S. J., Joshi, G. P., Revell, S. H., and Shaw, C. A. (1981). 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**(4), 395-408.
Hartwig, A. (1995). Current aspects in metal genotoxicity. *Biometals* **8**(1), 3-11.
IARC (1993). Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. Working Group views and expert opinions, Lyon, 9-16 February 1993. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* **58**, 1-415.
IARC (2006). Inorganic and organic lead compounds. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans* **87**.
Joiner, M. C., Marples, B., Lambin, P., Short, S. C., and Turesson, I. (2001). Low-dose hypersensitivity: current status and possible mechanisms. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **49**(2), 379-89.
Joubert, A., Zimmerman, K. M., Bencokova, Z., Gastaldo, J., Rénier, W., Chavaudra, N., Favaudon, V., Arlett, C., 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? *International journal of radiation biology* **84**(2), 1-19.
Paterson, M. C., Sell, B. M., Smith, B. P., and Bech-Hansen, N. T. (1982). Impaired colony-forming ability following gamma irradiation of skin fibroblasts from tuberous sclerosis patients. *Radiation research* **90**(2), 260-70.
Rothkamm, K., and Lobrich, M. (2003). Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(9), 5057-62.
Varela, I., Pereira, S., Ugalde, A. P., Navarro, C. L., Suarez, M. F., Cau, P., Cadinanos, J., Osorio, F. G., Foray, N., Cobo, J.*, et al.* (2008). Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging. *Nature medicine* **14**(7), 767-72.
Viau, M., Gastaldo, J., Z., B., Joubert, A., and Foray, N. (2008). Cadmium inhibits non-homologous end-joining and over-activates the MRE11-dependent repair pathway. . *Mutation Research* **654**, 13-21.
Wild, P., Bourgkard, E., and Paris, C. (2009). Lung cancer and exposure to metals: the epidemiological evidence. *Methods in molecular biology* **472**, 139-167.

Table 1 : Comparisons between recommendations for metal concentration in tap water and our data

Metal specie	Threshold metal concentration to reach 2 γH2AX foci per cell (µM)	WHO recommendations for tap water (µM)
$AlCl_3$	1	1.5
$CuCl_2$	10	11.7
$CuSO_4$	10	12.5
$ZnCl_2$	3	22.0
$NiCl_2$	0.3	1.5
$CdCl_2$	2	0.016
$Pb(NO_3)_2$	0.28	0.03
Na_2CrO_4	0.03	0.3
Na_2SeO_3	3	0.06
$FeCl_3$	0.3	1.2

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1: Unrepaired DSB after metal contamination. Number of γH2AX foci in the human untransformed radioresistant 149BR cells after incubation for 24 h with the indicated concentration of metal species. Each plot represents the mean ± standard error (SEM) of at least three replicates.

Figure 2: Residual micronuclei and highly damaged cells after metal contamination. A. Number of micronuclei per 100 cells in the human untransformed radioresistant 149BR cells after incubation for 24 h with the indicated concentration of metal species. Each plot represents the mean ± standard error (SEM) of at least three replicates. **B.** The γH2AX data shown in Figure 1 were plotted against the corresponding micronuclei ones shown in panel A. **C.** Number of HDC per 100 cells in the human untransformed radioresistant 149BR cells after incubation for 24 h with the indicated concentration of metal species. Each plot represents the mean ± standard error (SEM) of at least three replicates. **D.** The γH2AX data shown in Figure 1 were plotted against the corresponding HDC ones shown in panel C.

Figure 3: RI-DSB repair kinetics after metal contamination. A and B. Number of γH2AX foci as a function of repair time post-irradiation in the human untransformed radioresistant 149BR incubated for 24 h with the indicated concentration of metal species. Each plot represents the mean ± standard error (SEM) of at least two replicates. C. The γH2AX data shown in the panels A and B and obtained after 10 min post-irradiation were plotted against the metal concentration. The grey zone corresponds to the numerical values when all the RI-DSB are recognized. A decrease of the number of γH2AX foci is interpreted as a defect in the DSB recognition. D. The number of γH2AX foci assessed after 24 h metal contamination shown in Figure 1 were plotted against the number of of γH2AX foci assessed after 24 h metal contamination followed by an irradiation followed itself by 24 h repair time. The dotted line corresponds to a one to one correlation. The solid line is the result of a data fitting to a linear function.

Figure 4: Delay of the nucleo-shuttling after metal contamination. In the same conditions as described in Figure 3, anti-pATM immunofluorescence was applied to the 149BR cells to obtain pATMfoci kinetics. The pATM data obtained after 10 min post-irradiation were plotted against the metal concentration. The grey zone corresponds to the numerical values when all the RI-DSB are recognized. A decrease of the number of pATM foci is interpreted as a defect in the DSB recognition. Each plot represents the mean ± standard error (SEM) of at least two replicates.

Figure 5: Representative example of a tissue-dependent response to a metal contamination. A. and B. Number of γH2AX foci per cell (A) and micronuclei per 100 cells (B) in the human Hasp, Ha, Hah brain cells and the skin fibroblast 149BR cells after incubation for 24 h with the indicated concentration of $AlCl_3$. Each plot represents the mean ± standard error (SEM) of at least two replicates**. C.** The number of γH2AX foci shown in panel A was plotted against the corresponding number of micronuclei shown in panel B. Solid lines indicate is the result of a data fitting to a linear function.

Figure 6: Representative example of HRS phenomenon in cells contaminated after metal contamination. Number of γH2AX foci per cell in the human HMEC cells after incubation for 24 h with the indicated concentration of $AlCl_3$ presented in a linear (A) or a semi-log (B) scale. Each plot represents the mean ± standard error (SEM) of at least two replicates**.**

Figure 7: Unrepaired DSB and recommendations for metal concentration. Comparison between the current recommendations of WHO for metal concentration in tap water and the threshold concentration to reach 2 unrepaired DSB deduced from data shown in Figure 1. A systematic 15% relative error was applied to calculated values.

Figure 8: Mechanistic model of metal action. As detailed in discussion, the presence of metal specie may contribute to monomerize ATM and/or induce DSB. If the nucleo-shuttling of ATM is delayed, DSB will be not recognized by the NHEJ pathway. There are two possible consequences: either DSB are unrepaired, which triggers cell death and toxicity or DSB are misrepaired by an alternative DSB repair pathway, which triggers genomic instability and carcinogenicity.

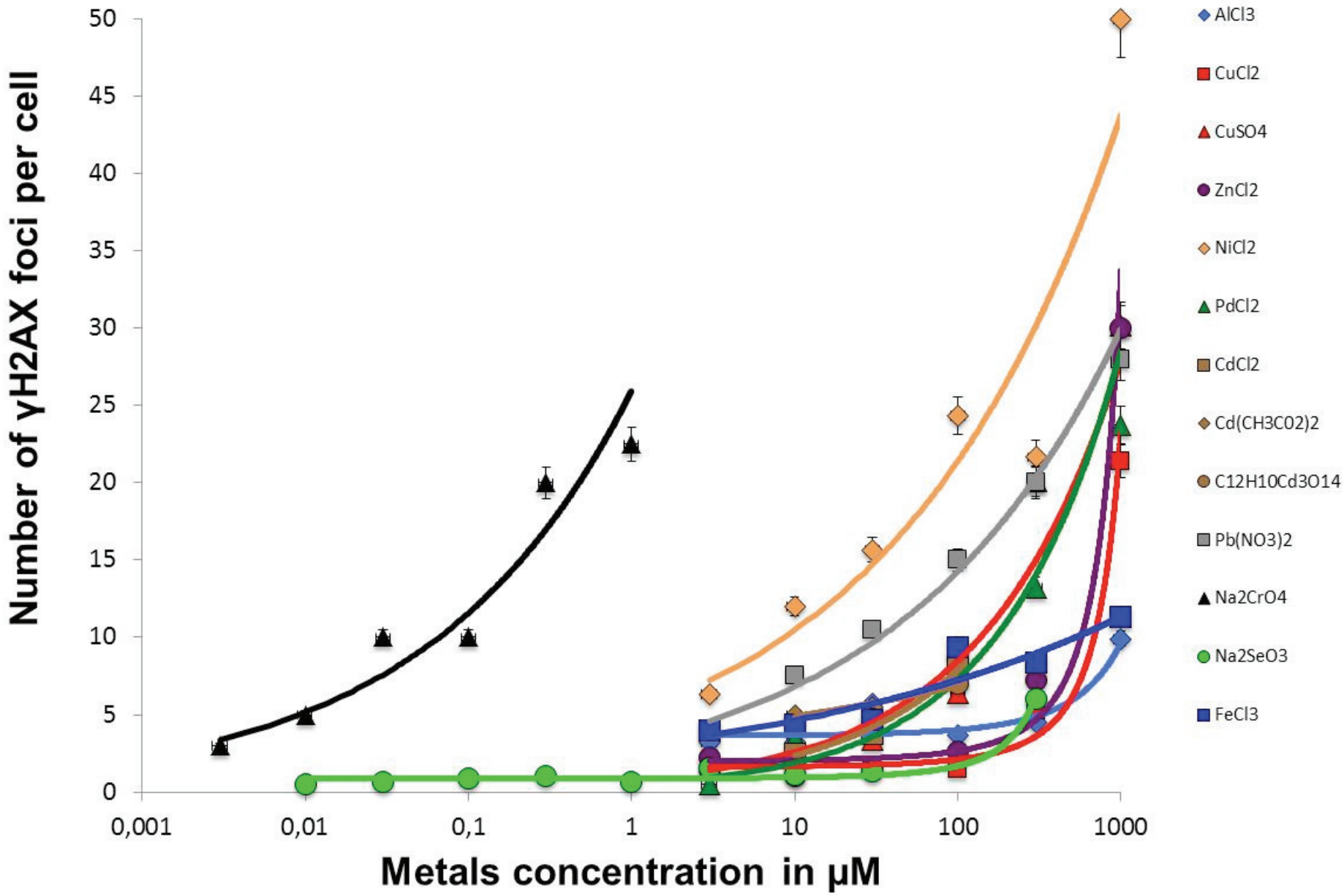
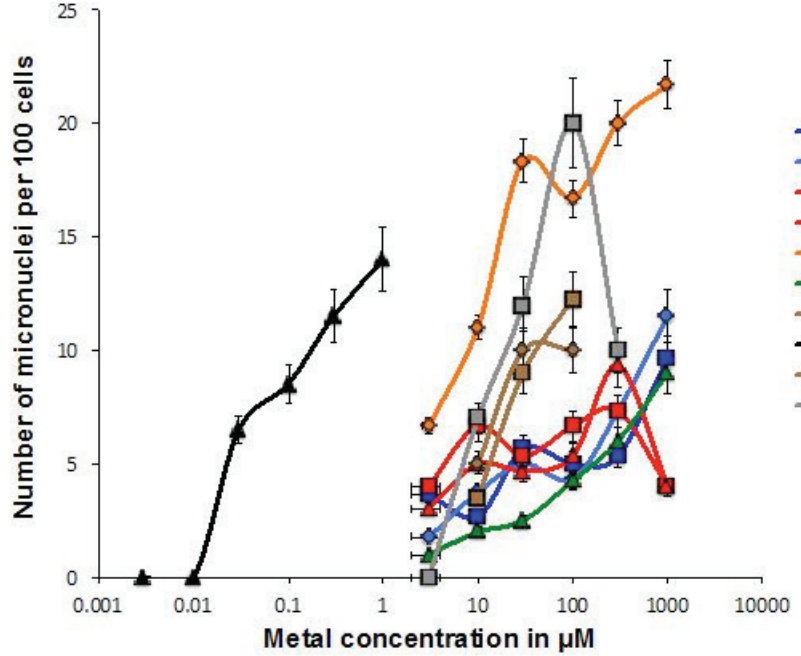
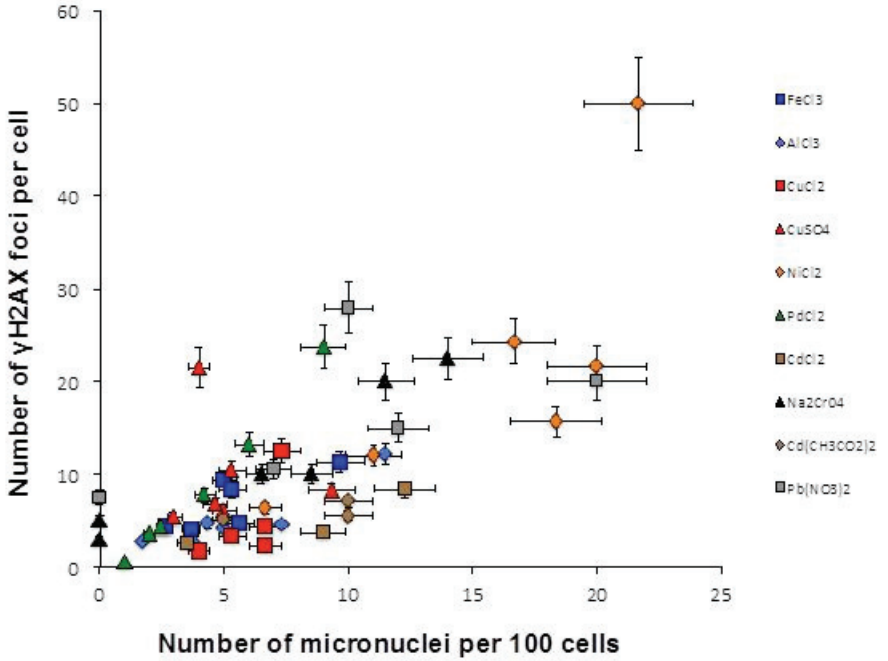
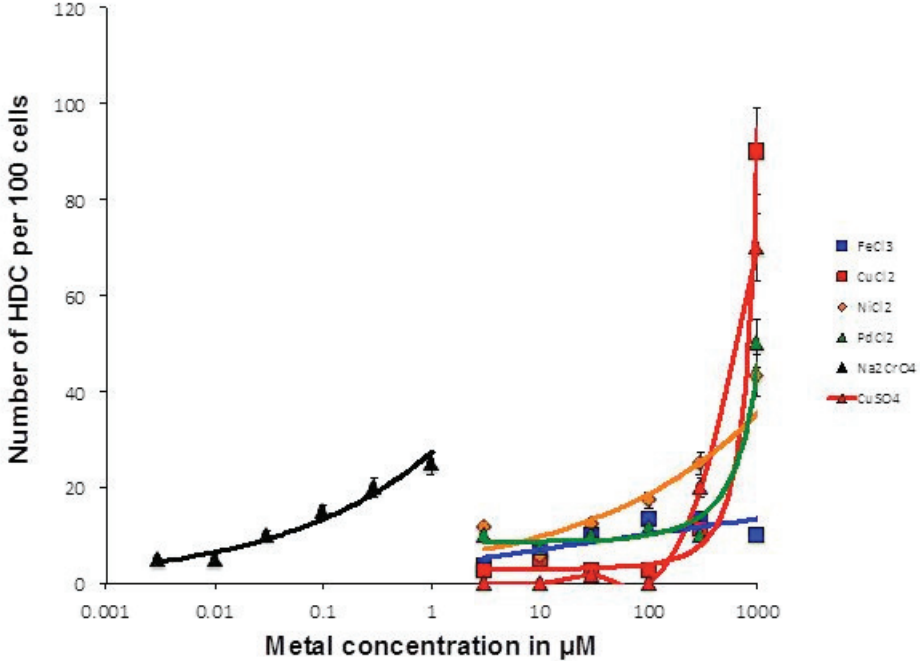

Number of γH2AX foci per cell
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
Metals concentration in µM
AlCl3
CuCl2
CuSO4
ZnCl2
NiCl2
PdCl2
CdCl2
Cd(CH3C02)2
C12H10Cd3O14
Pb(NO3)2
Na2CrO4
Na2SeO3
FeCl3

Fig. 1


Number of micronuclei per 100 cells
Metal concentration in µM
FeCl3
AlCl3
CuCl2
CuSO4
NiCl2
PdCl2
CdCl2
Na2CrO4
Cd(CH3CO2)2
Pb(NO3)2


Number of γH2AX foci per cell
Number of micronuclei per 100 cells
FeCl3
AlCl3
CuCl2
CuSO4
NiCl2
PdCl2
CdCl2
Na2CrO4
Cd(CH3CO2)2
Pb(NO3)2


Number of HDC per 100 cells
Metal concentration in µM
FeCl3
CuCl2
NiCl2
PdCl2
Na2CrO4
CuSO4

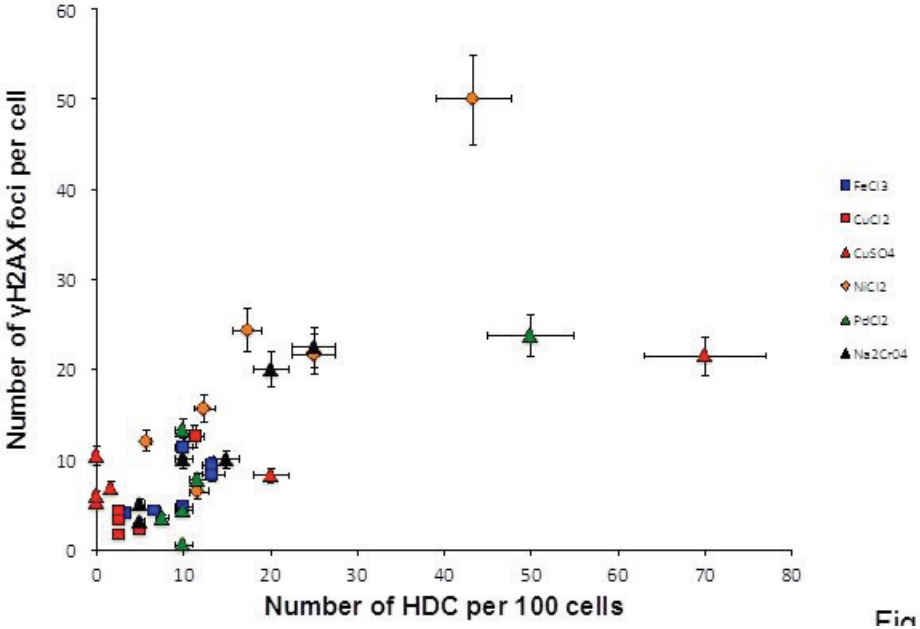

Number of γH2AX foci per cell
Number of HDC per 100 cells
FeCl3
CuCl2
CuSO4
NiCl2
PdCl2
Na2CrO4

Fig 2

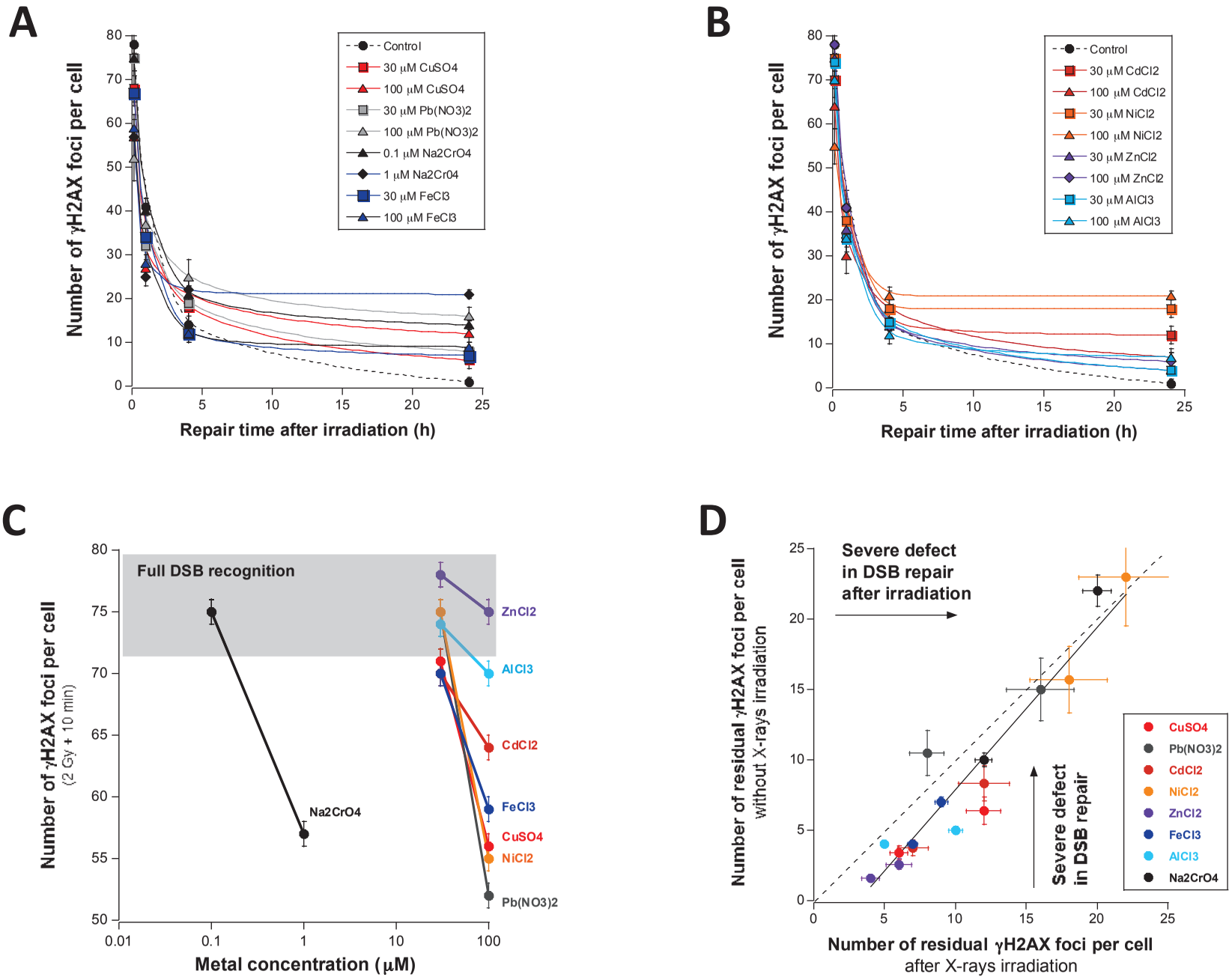

A
Number of γH2AX foci per cell
Repair time after irradiation (h)
Control
30 μM CuSO4
100 μM CuSO4
30 μM Pb(NO3)2
100 μM Pb(NO3)2
0.1 μM Na2CrO4
1 μM Na2Cr04
30 μM FeCl3
100 μM FeCl3
B
Number of γH2AX foci per cell
Repair time after irradiation (h)
Control
30 μM CdCl2
100 μM CdCl2
30 μM NiCl2
100 μM NiCl2
30 μM ZnCl2
100 μM ZnCl2
30 μM AlCl3
100 μM AlCl3
C
Full DSB recognition
Number of γH2AX foci per cell
(2 Gy + 10 min)
Metal concentration (μM)
Na2CrO4
ZnCl2
AlCl3
CdCl2
FeCl3
CuSO4
NiCl2
Pb(NO3)2
D
Severe defect
in DSB repair
after irradiation
Severe defect
in DSB repair
Number of residual γH2AX foci per cell
without X-rays irradiation
Number of residual γH2AX foci per cell
after X-rays irradiation
CuSO4
Pb(NO3)2
CdCl2
NiCl2
ZnCl2
FeCl3
AlCl3
Na2CrO4

Fig.3

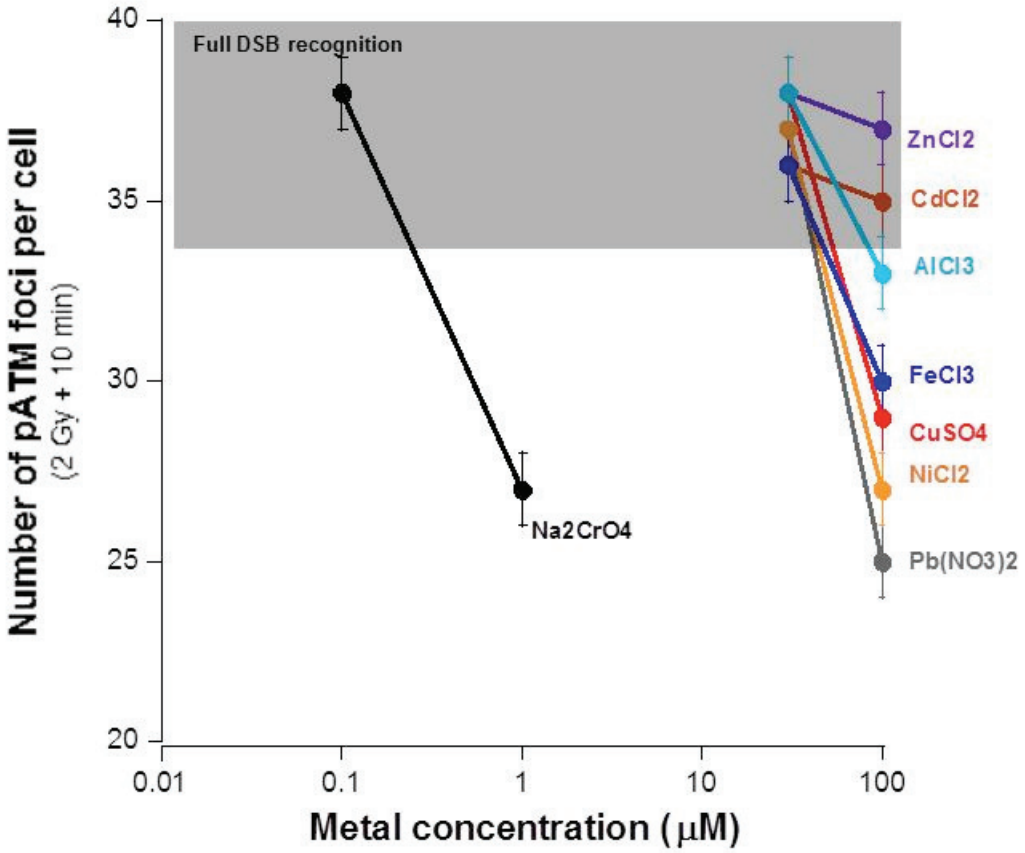

Full DSB recognition
Number of pATM foci per cell
(2 Gy + 10 min)
40
35
30
25
20
0.01
0.1
1
10
100
Metal concentration (μM)
Na2CrO4
ZnCl2
CdCl2
AlCl3
FeCl3
CuSO4
NiCl2
Pb(NO3)2

Fig 4

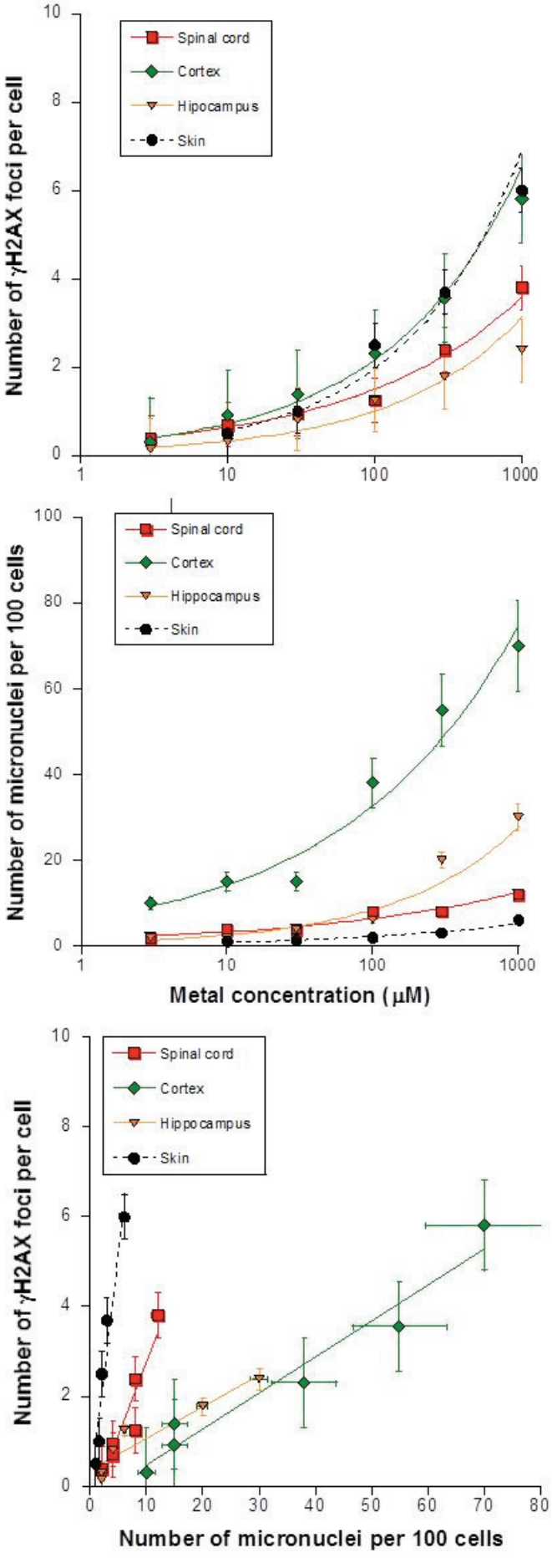
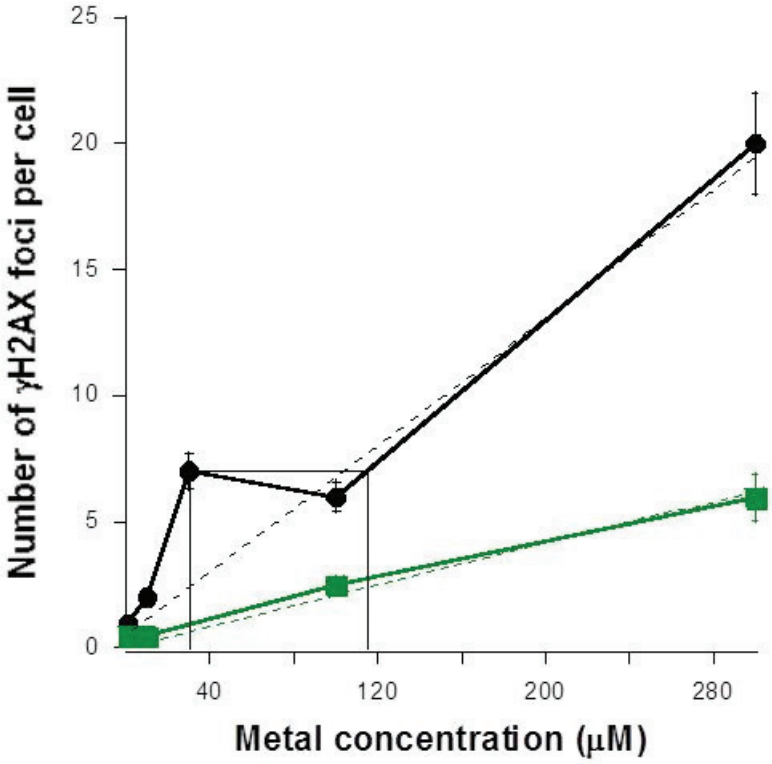

Spinal cord
Cortex
Hipocampus
Skin
Number of γH2AX foci per cell
Number of micronuclei per 100 cells
Metal concentration (μM)
Spinal cord
Cortex
Hippocampus
Skin
Number of γH2AX foci per cell
Number of micronuclei per 100 cells

Fig 5

A


Number of γH2AX foci per cell
25
20
15
10
5
0
40
120
200
280
Metal concentration (μM)

B

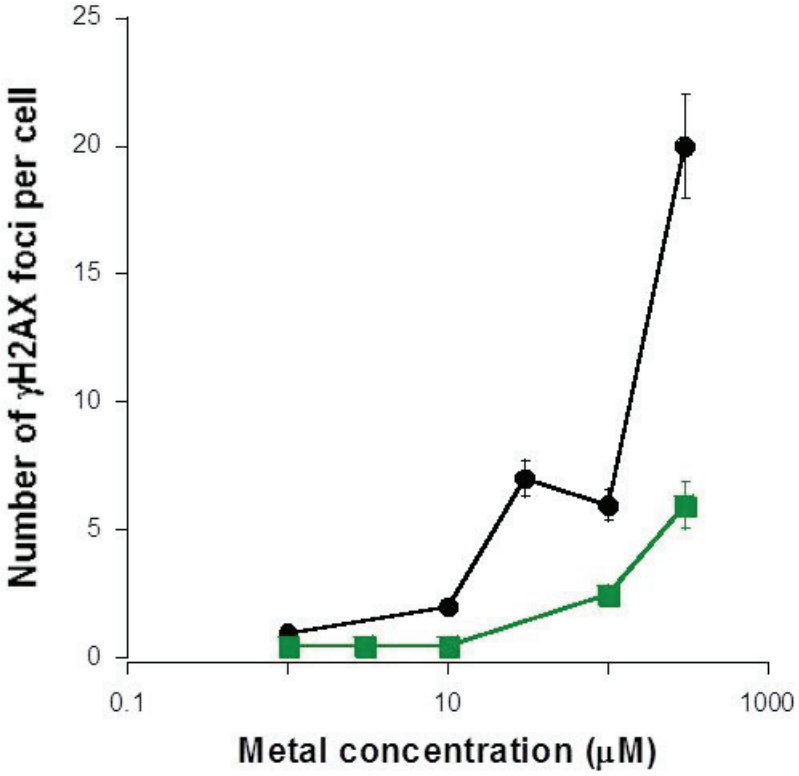

Number of γH2AX foci per cell
25
20
15
10
5
0
0.1
10
1000
Metal concentration (μM)

Fig 6

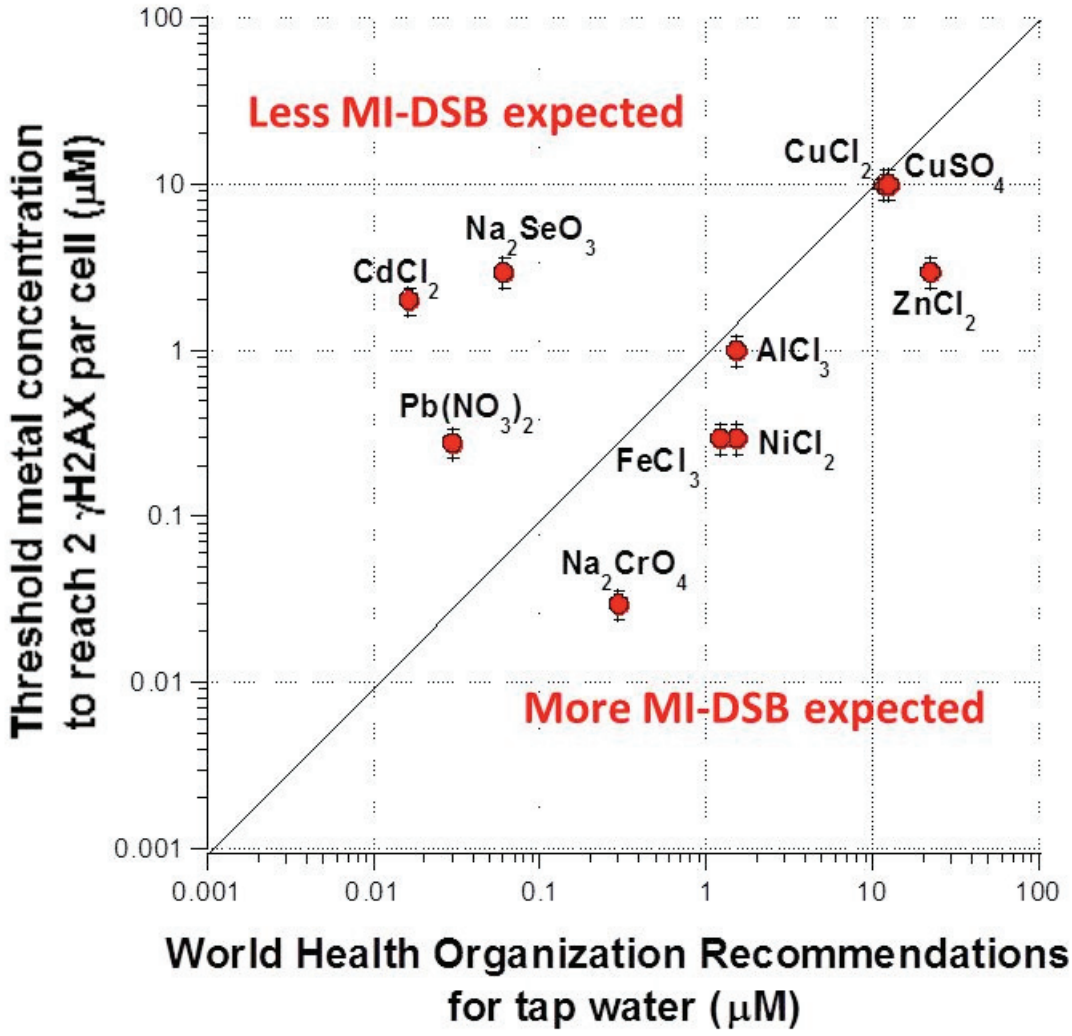

Less MI-DSB expected
More MI-DSB expected
CuCl2
CuSO4
Na2SeO3
CdCl2
ZnCl2
AlCl3
Pb(NO3)2
NiCl2
FeCl3
Na2CrO4
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Threshold metal concentration to reach 2 γH2AX par cell (μM)
World Health Organization Recommendations for tap water (μM)

Fig.7

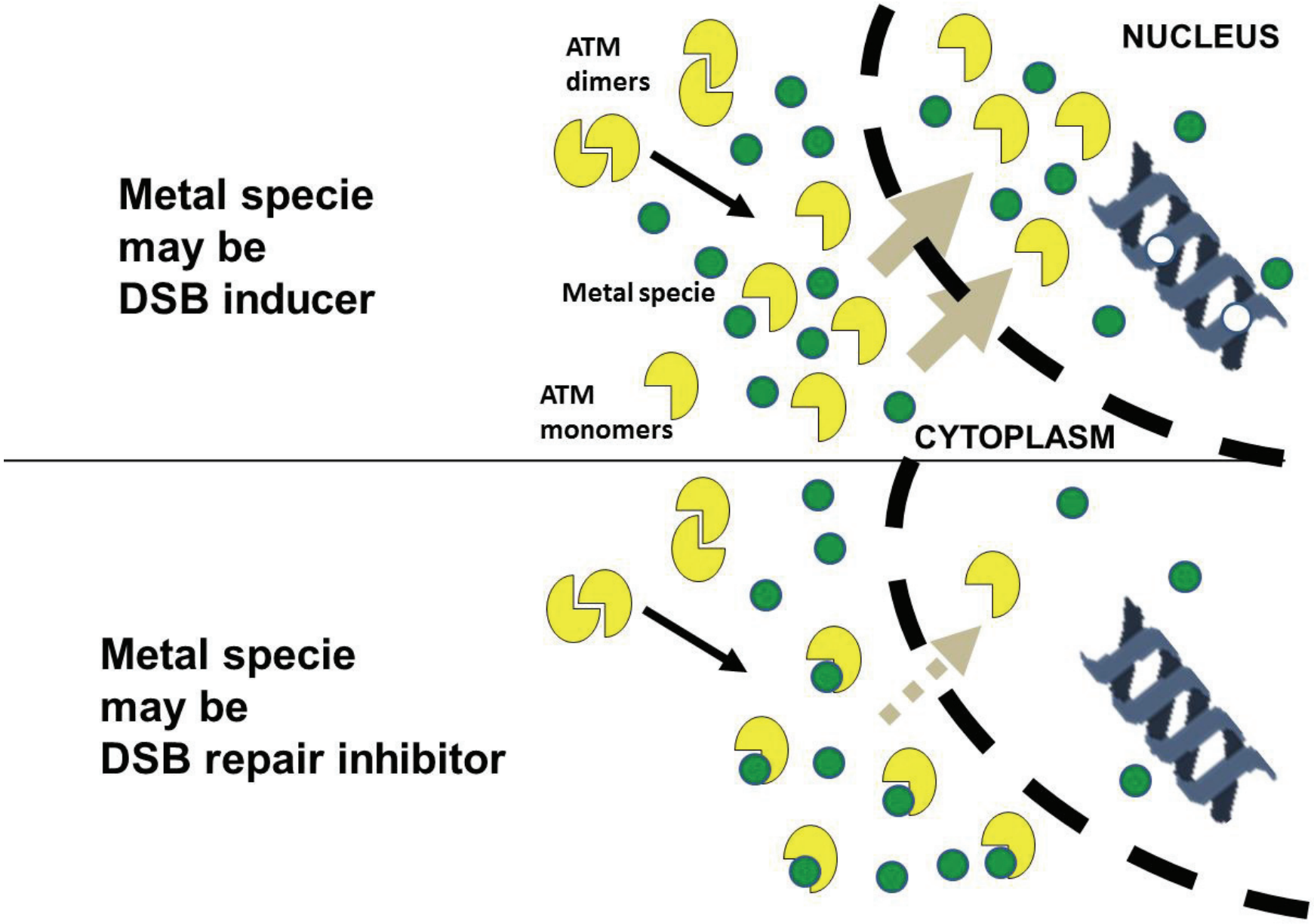

Metal specie
may be
DSB inducer
ATM
dimers
NUCLEUS
Metal specie
ATM
monomers
CYTOPLASM
Metal specie
may be
DSB repair inhibitor

Fig 8

REVUE A

Functional assays for individual radiosensitivity: a critical review

Mélanie L. Ferlazzo, MSc[*], Michel Bourguignon, MD, PhD[§], and Nicolas Foray, PhD[*]

[*]*Inserm, UMR 1052, Groupe de Radiobiologie, Centre de Recherche sur le Cancer, 28, rue Laennec, 69008 Lyon, France*
[§]*Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), 31 Avenue de la division Leclerc, 92260 Fontenay aux Roses, France*

Keywords: radiosensitivity; ionizing radiation; predictive assays; DNA repair

Running title: Functional assays for radiosensitivity

Conflict of interest: *NF is co-founder and scientific adviser of the Neolys Diagnostics company that will commercialize some predictive assays*

Acknowledgments: We thank the Association Pour la Recherche sur l'Ataxie-Telangiectasie (APRAT), the Centre National d'Etudes Spatiales (CNES) and the Commissariat Général à l'Investissement (INDIRA project).

Corresponding author: Nicolas Foray, *Inserm, UMR 1052, Groupe de Radiobiologie, Centre de Recherche sur le Cancer, 28, rue Laennec, 69008 Lyon, France.*

Tel.: (33) 4 26 55 67 94; fax.: (33) 04 78 78 26 80.
E-mail address: nicolas.foray@inserm.fr

Abstract

A complete understanding of the mechanisms of the response to radiation would help in a better evaluation of the radiation-induced risks. To this aim, individual radiosensitivity, i.e. the proneness to radiation-induced tissue reactions attributable to cell death has been documented since the beginning of the 20st century. Since several decades, to develop performant predictive assays is one of the most important challenges of radiobiologists. This paper is a critical review devoted to the major functional assays to predict radiosensitivity, their strengths and weaknesses, notably those based on the quantification of clonogenic cell survival, micronuclei, p21 expression, apoptosis, chromosome and DNA repair and signaling. Genomic approaches of radiosensitivity are reviewed in another article of this issue.

Introduction

Less than one year after the X-rays discovery by Roentgen[1], Voigt described the first radiation-induced (RI) cutaneous reactions.[2] Thereafter RI tissue reactions concerning other parts of the body were pointed out progressively.[3] At the beginning of the 20th century, the pioneers of radiation were aware that these RI tissue reactions were attributable to cell death[4,5] due to radiation dose excess or individual radiosensitivity.[6-8]

The first RI cancer was described by Frieben in 1902[9]. Between 1917 and 1926, the radium dial painters currently called "*the radium girls*", represented the first cohort of RI cancer cases.[10] This period coincided with the first international congresses of radiology. While the pioneers of radiation initially devoted the term "radiosensitivity" to RI tissue reactions, this term has also been used to describe RI cancer proneness, (Britel et al., submitted) but the confusion between these two notions must be avoided [13].

To date, there is increasing evidence that RI tissue reactions and cancers are not necessarily caused by the same molecular mechanisms. For example, the Li-Fraumeni syndrome caused by heterozygous *p53* mutations is associated with high cancer risk but not with severe RI tissue reactions.[11] Conversely, ataxia telangiectasia (AT) caused by homozygous *ATM* mutations is associated with both post-radiotherapy (RT) fatal reaction and high lymphoma/leukemia risk.[12] Hence, we proposed to keep the historical meaning of the term "radiosensitivity" (i.e., the proneness to RI tissue reactions attributable to cell death), and to use "radiosusceptibility" to describe the proneness to RI cancer, more likely attributable to cell transformation[13].

Individual radiosensitivity is a critical issue in radiotherapy (RT) whose reliable imposes some specific constraints:

- radiosensitivity is not an *all-or-none* but *continuous* phenomenon that is associated with a large spectrum of tissue reactions ranging from simple burns to patient death.[14,15] Predictive assays should reflect this continuous spectrum of responses.
- occurrences of RI tissues reactions are *dose-dependent*. One of the most representative examples of this dose-dependence is the case of a young patient who suffered from *LIG4* mutations and who succumbed during RT against lymphoma: death occurred after the first RT sessions while he did not elicit any tissue reactions before.[16,17] Predictive assays should provide data from irradiated cells .
- radiosensitivity can be observed on different tissues. Predictive assays should therefore reflect the *tissue-dependence* of radiosensitivity by involving the most representative cellular model of RI tissue reactions.[13]
- a *quantified* relationship between clinical, cellular and molecular endpoints is required to consolidate the relevance of predictive assays.

This paper is a critical review devoted to the major functional assays to predict radiosensitivity, their strengths and weaknesses. Genomic approaches of radiosensitivity are reviewed in another article of this issue.

Tissular biomarkers of radiosensitivity

RI tissue reactions are generally observed after RT at doses higher than 0.5 Gy in a context of accidental dose excess (dosimetry error) or individual radiosensitivity.[13] They are very various: inflammations, infections, ulcerations, fibrosis, necrosis,… Early dermatitis during RT against breast cancers and late proctitis after RT against prostate cancers are the most frequent ones.[18] RI reactions are usually classified into early and late ones. However, there is now evidence that their occurrence may cover a continuous period of time beginning from the first RT session and ending some months or years after the last one.[19] Since the 1970s, AT is considered as the most radiosensitive genetic

syndrome[20]. To date, although one case of decease after RT was still reported recently[21], fatal issues after radiotherapy are extremely rare since the specific clinical features of AT are detectable in pediatrics. Hence, the RI tissue reactions in RT affect *morbidity* rather than *lethality*.

To date, about 5-20% patients show RI tissue reactions after RT[22]. Since 1979, a number of clinical classifications of RI tissue reactions have flourished in literature.[23] The Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE)[24] and Radiation Therapy Oncology Group (RTOG)[25] scales are the most extensively used. These two scales classify RI tissue reactions into 6 grades (grade 0: no event; grade 5: death), independently of the irradiated organs and the early/late nature of RI reactions.

RI inflammations and tissue reactions are the complex result of successive molecular and cellular events. Particularly, the majority of early-induced cytokines are pro-inflammatory. Hence, the RI expression of some cytokines, mainly IL6 or TGFβ has long been considered to be predictive biomarkers of post-RT inflammation.[26,27] For example, some circulating cytokine levels appeared to be good predictive markers of specific post-RT adverse effects (generally of severity grade equal or higher than 2), notably for RT against lung cancer.[28,29] Recently, expression of TGFβ observed at the week 6 of RT was found to be correlated with pneumonitis in patients with non-small-cell lung cancer treated with three-dimensional conformal RT.[30] Conversely, the same endpoints seem not to be correlated with late fibrosis, raising the question of the tissue-specificity of cytokine assays.[31]

Another question raised by the cytokine assays is that they reflect pre-inflammatory events that are downstream the DNA damage repair and signaling ones: they may be positive for different molecular and genetic origins. Furthermore, the cytokine assays require sampling *during RT* and therefore data may be obtained too late to allow

efficient countermeasures. Further investigations are therefore needed to examine whether cytokine assays can be used practically as predictive assays for specific RT and/or tumor localizations.

Cellular biomarkers of radiosensitivity

There are 3 major cell death pathways observed after irradiation that unequally contribute to the global inactivation of cellular clonogenic potential: mitotic death, apoptosis and senescence. Interestingly, these types of cell death were already described much before the X-rays discovery.[32]

Mitotic death results in the formation of irreversibly damaged chromosomal fragments (micronuclei) expulsed from nucleus.[33]. It is the most frequent RI death for proliferating cells.[34] The number of residual micronuclei was correlated with RI clonogenic inactivation.[35]

Senescence results in an irreversible permanent G_1 arrest.[36] It is the most frequent RI death for quiescent cells, notably for doses higher than 4 Gy. One of the most reliable endpoint of senescence is the expression of CDKN1A/p21. Post-irradiation expression was shown to be significantly reduced for CDKN1A/p21 in radiosensitive breast cancer patients. However, because of an overlap between radioresistant and radiosensitive patients, it was not possible to predict a normal tissue response while, by using a cutoff of seven-fold CDKN1A/p21 expression increase, the radiosensitive status was identified in about 91% patients tested.[37] Nevertheless, the relevance of the CDKN1A/p21 expression assay remains to be validated for a larger spectrum of radiosensitivity cases.

Apoptosis is one of the most documented death pathways while it is one of the rarest: apoptosis is mainly observed in lymphocytes and very rarely in fibroblasts. Since AT (*ATM*-mutated) and Li Fraumeni (*p53*-mutated) cells do not show apoptosis while they

are hyper-radiosensitive and radioresistant, respectively[11], apoptosis alone cannot be a reliable predictor of radiosensitivity. Besides, there is still no general correlation between cellular radiosensitivity and apoptosis.[38,39] An inversed correlation between apoptosis and RI tissue reactions was observed after 8 Gy in lymphocytes of hundreds RT patients, such that *the lower the apoptosis yield, the highest the radiosensitivity*.[40-42] Another study performed at 2 Gy indicated that *the higher the apoptosis yield, the highest the radiosensitivity.*[43] This last study also showed than apoptosis even combined with some polymorphisms can predict only acute dermatitis (10 cases) but not all the other RI tissue reactions (84 cases) including late fibrosis from a cohort of breast cancer patients. [43] Lastly, apoptosis assay in lymphocytes in a large series of breast cancer patients failed to show any association with RI reactions.[44] The statistical performances of apoptosis assays, when they are mentioned, are generally low: hence, the predictive power of apoptosis should be considered with caution.

Hence, assays based on the assessment of only one cell death pathway are not reliable enough for predicting radiosensitivity, probably because all the RI cell death pathways contribute differently and in a dose-dependent manner to the final response to radiation. The clonogenic cell survival assays reflect the contributions of each cell death pathway described above. It is noteworthy than dye exclusion assays do not account for senescence since irreversibly arrested cells are not clonogenic but can exclude dyes.[45] Clonogenic assays require 1-2 weeks to get countable colonies: they are therefore too time-consuming to be used in routine clinical approach. The relationship between clonogenic cell survival and radiosensitivity was considerably documented[46] and surveys of human radiosensitivity permit to draw several conclusions.[14,47] First, the survival fraction at 2 Gy (SF2) is one of the best parameters used to quantify radiosensitivity and the continuous spectrum of SF2 values is in good agreement with

the clinical response to radiation.[14] The most hyper-radiosensitive cells (SF2 ranging from 1 to 5%) derive from leukemia/lymphoma patients suffering from homozygous *ATM* mutations and *LIG4* mutations (only one case) who succumbed after radiotherapy.[16]

A subcategory of radiosensitive cells (SF2 ranging from 5 to 50%) derives from patients suffering from well-characterized genetic syndromes associated with defect in DNA double-strand breaks (DSB) repair. This is notably the case for Nijmegen breakage syndrome (*NBS1* mutations), AT-like disorder (ATLD) (*MRE11* mutations), Fanconi anemia (*FANC* genes mutations), Bloom's syndrome (*BLM* mutations), xeroderma pigmentosum (*XP* genes mutations), Cockayne syndrome (*CS* genes mutations), and *LIG1* mutations.[14] However, the cumulative incidence of these syndromes does not exceed 2%: they represent therefore a minority of RT patients that are mostly detectable in clinical paediatrics.

Another subcategory of radiosensitive cells (SF2 also ranging from 5 to 50%) derives from patients suffering either unknown syndromes or syndromes without direct DSB repair defects. These syndromes are generally caused by cytoplasmic mutated proteins such as neurofibromatosis[48], Huntington's chorea[49], Bruton's disease[50] or Gorlin syndrome.[51] The radiosensitivity of these syndromes is in discrepancy with the paradigm that DSB repair defect is the major cause of an abnormal RI response.

The analysis of SF2 values of syndromes cited above are useful since it permits to identify the genes of the response to radiation, whether involved in DSB repair or not. Since the SF2 of the *ATM*-mutated cells is systematically lower than that of the other radiosensitivity cases, the ATM protein is likely to be upstream the molecular process of radiation response : a hierarchy can be established between the functions of these genes.[52] Mutations of genes other than *ATM* may be associated with similar values of

SF2 (e.g. *BLM* and *FANC* mutations) [53], suggesting that biomarkers based on the functionality of one single gene whose function is downstream ATM cannot predict all the extent of radiosensitivity.

Cytogenetics analysis permits to identify chromosome breaks and aberrations. At the end of the 19th century, Regaud revolutionarized the evaluation of RI effects by developing a technique enabling the staining of chromatin.[5] Giemsa staining in the 1950s [54] and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques in the 1980s[55] provided new advances in cytogenetics. The link between unrepaired chromosome breaks and radiosensitivity was abundantly documented in a number of genetic syndromes.[56] One single unrepaired chromosome break was shown to induce a lethal event in human fibroblasts.[57] As expected, the number of chromosome breaks is correlated with the number of micronuclei evoked above. However, since the ranges of unrepaired chromosome and of micronuclei are quite small numerically (0-12% and 0-25 per 100 cells, respectively for reflecting SF2 ranging from 1 to 60%), the predictive power of cytogenetic endpoints is limited (Figure 1).[53] It is noteworthy that unrepaired chromosome are more likely associated with lethality (radiosensitivity) while chromosome aberrations are rather linked to cell transformation, genomic instability and cancer proneness (radiosusceptibility). Unfortunately, there is a frequent confusion in the biological interpretation of these two endpoints.[13] Like clonogenic cell survival assays, cytogenetic assays are too time-consuming to predict radiosensitivity in routine.

Molecular functional assays for predicting radiosensitivity

Among all the RI DNA damage, unrepaired DSB appear to be the key-endpoint for radiosensitivity since micronuclei and unrepaired chromosome breaks are directly originated from unrepaired DSB and since DSB repair defect diseases are systematically

associated with radiosensitivity.[53] Hence, from the 1970s, a plethora of DSB repair assays were developed. Unfortunately, the number of experimental protocols differing by the dose and the repair time did not help the identification of the most performant assays but three conclusions can be drawn: 1) the longer the repair times the better the correlation with radiosensitivity; 2) the initial radiation dose required for DSB repair assays used before 2003 was too high (some tens of Gy) to permit extrapolations to clinically relevant doses; 3) a mechanistic model of DSB repair in mammalians is required to better choose the most relevant molecular predictive assay.[13,53,58]

From 2003, the ATM-dependent phosphorylation of the variant histone H2AX phosphorylated on serine 139 (γH2AX) was shown to be one of the earliest RI events, through its relocalization as discrete nuclear foci, easily quantifiable by immunofluorescence.[59] The formation of γH2AX foci was also shown to be the recognition step of the DSB managed by the non-homologous end-joining (NHEJ), the major DSB repair and signalling pathway in mammalians. The γH2AX assay allows the determination of each individual RI DSB with a one-to-one correlation between RI DSB and γH2AX foci.[59] It is noteworthy that there is no correlation between radiosensitivity and the number of DSB *induced* by radiation. In human fibroblasts, the number of unrepaired DSB assessed by the γH2AX assay generally ranges from 0 to 12 after 2 Gy followed by 24 h for repair (Figure 1).[53,60]

Some other proteins were shown to localize as discrete nuclear foci after irradiation. It is notably the case of DNA-PK and MDC1 that are NHEJ actors and of MRE11, BRCA1 and BRCA2 that participate to the recombination DSB repair pathways whose dysfunction is linked to cancer proneness. Generally organized in a ATM-dependent RI phosphorylation cascade[52], the proteins cited above are likely downstream the ATM activity and the H2AX phosphorylation and cannot reflect the large spectrum of

radiosensitivity. In addition, a particular care must be taken with co-immunofluorescence data since the overlap of emission and/or absorption spectrum of some immunofluorescence dyes may bias a number of co-localizations[61]. For example, the γH2AX and 53BP1 proteins may not be partners in all the conditions of irradiation and for all the radiosensitivity range.[53,62]

Conclusions of studies aiming to establish correlation between γH2AX foci and RI tissue reactions are contradictory.[63] The great majority of studies involve: 1) lymphocytes whose use may affect results with apoptosis; 2) different protocols with doses ranging from 0.5 to 8 Gy and investigated repair times ranging from 0.5 to 24 h; 3) a low number of patients (lower than 75) with a distribution of reaction severities that is non-representative of the clinical reality (e.g., few intermediate responses (grade 2) are included in the studies). In our hands, the number of residual γH2AX foci appeared to be a reliable predictor for the most hyper-radiosensitive cases (grade 5) but was not correlated with CTCAE grades in a cohort of 117 patients when intermediate responses are considered (grade 1-3).[60] Hence, γH2AX immunofluorescence alone was not sufficient to predict the moderate radiosensitivity cases. The positive correlations shown in table 1 could be explained by a grade-distribution that would favour an *all-or-none* effect. Lastly, let remind that DSB repair defect syndromes are systematically associated with radiosensitivity. However, all radiosensitive syndromes are not necessarily associated with DSB repair defect: the new challenge of the prediction of radiosensitivity is therefore to better understand and predict the intermediate responses to radiation. [53,60]

The ATM nucleo-shuttling assay

A possible explanation of the intermediate radiosensitivity of syndromes caused by mutations of cytoplasmic proteins and that are not directly involved in DSB repair was recently proposed.[60,64] Irradiation triggers the monomerization of the cytoplasmic ATM dimers (pATM) in a dose-dependent manner. Thereafter, the ATM monomers diffuse in nucleus, phosphorylate H2AX which triggers NHEJ and phosphorylate nucleases, like MRE11, which inactivates them. Any impairment or delay in the nucleo-shuttling of ATM may result in radiosensitivity and/or genomic instability (Figure 1). For example, in cells showing intermediate response, some mutated proteins, like huntingtin[49,65], whose expression is deregulated, sequestrate ATM in cytoplasm, which delays the ATM nucleo-shuttling. Consequently, DSB repair is not complete and genomic instability occurs. Interestingly, a quantitative correlation between RTOG and CTCAE grades and the delay of the ATM nucleo-shuttling (reflected by the nuclear pATM foci) was reported in 100 radiosensitive cancer patients.[60] Interestingly, the numerical range of the number of pATM foci is quite similar to that of SF2, which makes mathematically possible a good discrimination between the radiosensitivity cases (Figure 2). Lastly, the theory of the ATM nucleoshuttling allows a biological interpretation of the linear-quadratic model, that links survival and dose and remained empirical since the 1970s.[64]

Conclusions

A complete understanding of the mechanisms of the response to radiation would help in a better evaluation of the RI risk in radiosensitive patients. While patients suffering from the most radiosensitive syndromes are rare, 5-20% radiotherapy patients show RI morbidity tissue reactions, which may affect their treatment: to predict individual radiosensitivity is therefore a medical, economical and societal issue. Clonogenic cell

survival appears to be the best endpoint to discriminate all the radiosensitive cases. Unfortunately, this assay is too time-consuming to be applied in routine in clinics; this explains the high interest for molecular assays that are generally faster. Nevertheless, faster assays are not necessarily more reliable and performant. Indeed, to predict radiosensitivity reliably requires a number of constraints for the chosen endpoint like scientific relevance, dose-dependence, a large and continuous numerical scale, and high ability to consider intermediate responses (Table 1). While some functional assays seem to be promising, literature shows that, despite catchy titles, most reports do not provide all the necessary data to fairly evaluate the performances of the described assays. We hope that this critical review will be useful to increase knowledge of the intrinsic mechanisms of radiation response in order to develop reliable predictive assays of individual radiosensitivity to be used in personalized RT.

References

1. Roentgen W. Über eine neue art von strahlen. Vorläufige mitteilung. . Aus den Sitzungsberichten der Würzburger Physik-medic Gesellschaft Würzburg:S 137–147, 1895
2. Despeignes V. Nouvelle observation de cancer traité par les rayons de roentgen. Lyon Médical;83:550-551, 1896
3. Bouchacourt L. Sur la différence de sensibilité aux rayons de roentgen de la peau des différents sujets, et, sur le même sujet des différents régions du corps. Comptes-Rendus des Sessions de l'Association Française pour l'Avancement des Sciences 40ème Congrès - Dijon:942-947, 1911
4. Mould RF. A century of x-rays and radioactivity in medicine: Institute of Physics Publishing; 1993.
5. Regaud C. Notice sur les travaux scientifiques publiés de 1893 à 1935Paris: Presses Universitaires de France; 1935.
6. Association française pour l'avancement des sciences. Compte-rendu de la 35ème session - electricité médicale. In: Masson, editor. Lyon. 1906. pp. 243-248.
7. 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;15:604, 1907
8. Arcelin F. Existe-t-il en radiothérapie des idiosyncrasies spontanées ou acquises. Archives d'Electricité Médicale;10:37-61, 1911
9. Frieben A. Cancroid des rechten handrückens. Deutsche medicinische Wochenschrift;28:335, 1902
10. Gunderman RB, Gonda AS. Radium girls. Radiology;274:314-318, 2015
11. Foray N, Randrianarison V, Marot D, Perricaudet M, Lenoir G, Feunteun J. Gamma-rays-induced death of human cells carrying mutations of brca1 or brca2. Oncogene;18:7334-7342, 1999
12. Boultwood J. Ataxia telangiectasia gene mutations in leukaemia and lymphoma. Journal of clinical pathology;54:512-516, 2001
13. Foray N, Bourguignon M, Hamada N. Individual response to ionizing radiation. Mutation Research Review;770:369-386, 2016
14. Deschavanne PJ, Fertil B. A review of human cell radiosensitivity in vitro. International journal of radiation oncology, biology, physics;34:251-266, 1996
15. Foray N, Colin C, Bourguignon M. 100 years of individual radiosensitivity: How we have forgotten the evidence. Radiology;264:627-631, 2012
16. Plowman PN, Bridges BA, Arlett CF, Hinney A, Kingston JE. An instance of clinical radiation morbidity and cellular radiosensitivity, not associated with ataxia-telangiectasia. The British journal of radiology;63:624-628, 1990
17. Badie C, Iliakis G, Foray N, Alsbeih G, Pantellias GE, Okayasu R, Cheong N, Russell NS, Begg AC, Arlett CF, et al. Defective repair of DNA double-strand breaks and chromosome damage in fibroblasts from a radiosensitive leukemia patient. Cancer research;55:1232-1234, 1995
18. Dorr W. Skin and other reactions to radiotherapy--clinical presentation and radiobiology of skin reactions. Frontiers of radiation therapy and oncology;39:96-101, 2006
19. Dorr W, Hendry JH. Consequential late effects in normal tissues. Radiotherapy and oncology;61:223-231, 2001

20. Taylor AM, Harnden DG, Arlett CF, Harcourt SA, Lehmann AR, Stevens S, Bridges BA. Ataxia telangiectasia: A human mutation with abnormal radiation sensitivity. Nature;258:427-429, 1975
21. Pietrucha BM, Heropolitanska-Pliszka E, Wakulinska A, Skopczynska H, Gatti RA, Bernatowska E. Ataxia-telangiectasia with hyper-igm and wilms tumor: Fatal reaction to irradiation. J Pediatr Hematol Oncol;32:e28-30, 2010
22. ICRP. Icrp statement on tissue reactions and early and late effects of radiation in normal tissues and organs-threshold doses for tissue reactions in a radiation protection context. Publication 118. Annals of the ICRP;41:1-322, 2012
23. Morère J-F, Mornex F, Soulières D. Thérapeutique du cancer. Paris: Springer-Verlag; 2011.
24. 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. Seminars in radiation oncology;13:176-181, 2003
25. 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;31:1341-1346, 1995
26. Williams J, Chen Y, Rubin P, Finkelstein J, Okunieff P. The biological basis of a comprehensive grading system for the adverse effects of cancer treatment. Seminars in radiation oncology;13:182-188, 2003
27. Centurione L, Aiello FB. DNA repair and cytokines: Tgf-beta, il-6, and thrombopoietin as different biomarkers of radioresistance. Frontiers in oncology;6:175, 2016
28. Wang J, Qiao XY, Lu FH, Zhou ZG, Song YZ, Huo JJ, Liu X. Tgf-beta1 in serum and induced sputum for predicting radiation pneumonitis in patients with non-small cell lung cancer after radiotherapy. Chinese journal of cancer;29:325-329, 2010
29. Kim JY, Kim YS, Kim YK, Park HJ, Kim SJ, Kang JH, Wang YP, Jang HS, Lee SN, Yoon SC. The tgf-beta1 dynamics during radiation therapy and its correlation to symptomatic radiation pneumonitis in lung cancer patients. Radiation oncology;4:59, 2009
30. Liu Y, Xia T, Zhang W, Zhong Y, Zhang L, Wang X, Yu H. Variations of circulating endothelial progenitor cells and transforming growth factor-beta-1 (tgf-beta1) during thoracic radiotherapy are predictive for radiation pneumonitis. Radiation oncology;8:189, 2013
31. Mazeron R, Etienne-Mastroianni B, Perol D, Arpin D, Vincent M, Falchero L, Martel-Lafay I, Carrie C, Claude L. Predictive factors of late radiation fibrosis: A prospective study in non-small cell lung cancer. International journal of radiation oncology, biology, physics;77:38-43, 2010
32. Clarke PG, Clarke S. Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. Anatomy and embryology;193:81-99, 1996
33. 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;39:395-408, 1981
34. 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.
35. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. Mutat Res;455:81-95, 2000
36. Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent g1 arrest and long-term induction of cip1 in normal human fibroblasts. Genes & development;8:2540-2551, 1994
37. Badie C, Dziwura S, Raffy C, Tsigani T, Alsbeih G, Moody J, Finnon P, Levine E, Scott D, Bouffler S. Aberrant cdkn1a transcriptional response associates with abnormal sensitivity to radiation treatment. British journal of cancer;98:1845-1851, 2008
38. 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;68:1169-1177, 2007
39. Schmitz A, Bayer J, Dechamps N, Thomas G. Intrinsic susceptibility to radiation-induced apoptosis of human lymphocyte subpopulations. International journal of radiation oncology, biology, physics;57:769-778, 2003
40. Ozsahin M, Crompton NE, Gourgou S, Kramar A, Li L, Shi Y, Sozzi WJ, Zouhair A, Mirimanoff RO, Azria D. Cd4 and cd8 t-lymphocyte apoptosis can predict radiation-induced late toxicity: A prospective study in 399 patients. Clinical Cancer Research;11:7426-7433, 2005
41. 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;38:429-440, 1997
42. Azria D, Riou O, Castan F, Nguyen TD, Peignaux K, Lemanski C, Lagrange JL, Kirova Y, Lartigau E, Belkacemi Y, Bourgier C, Rivera S, Noel G, Clippe S, Mornex F, Hennequin C, Kramar A, Gourgou S, Pelegrin A, Fenoglietto P, Ozsahin EM. Radiation-induced cd8 t-lymphocyte apoptosis as a predictor of breast fibrosis after radiotherapy: Results of the prospective multicenter french trial. EBioMedicine;2:1965-1973, 2015
43. Baijer J, Dechamps N, Perdry H, Morales P, Kerns S, Vasilescu A, Baulande S, Azria D, Romeo PH, Schmitz A. Tnfsf10/trail regulates human t4 effector memory lymphocyte radiosensitivity and predicts radiation-induced acute and subacute dermatitis. Oncotarget, 2016
44. Finnon P, Kabacik S, MacKay A, Raffy C, A'Hern R, Owen R, Badie C, Yarnold J, Bouffler S. Correlation of in vitro lymphocyte radiosensitivity and gene expression with late normal tissue reactions following curative radiotherapy for breast cancer. Radiotherapy and oncology ;105:329-336, 2012
45. Sumantran VN. Cellular chemosensitivity assays: An overview. Methods in molecular biology;731:219-236, 2011
46. Fertil B, Malaise EP. Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. International journal of radiation oncology, biology, physics;7:621-629, 1981
47. Arlett CF, Harcourt SA. Survey of radiosensitivity in a variety of human cell strains. Cancer research;40:926-932, 1980
48. Hannan MA, Sackey K, Sigut D. Cellular radiosensitivity of patients with different types of neurofibromatosis. Cancer genetics and cytogenetics;66:120-125, 1993
49. 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;49:1200-1211, 2014
50. 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;54:2544-2547, 1994
51. Kleinerman RA. Radiation-sensitive genetically susceptible pediatric sub-populations. Pediatric radiology;39 Suppl 1:S27-31, 2009
52. 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. The EMBO journal;22:2860-2871, 2003
53. Joubert A, Zimmerman KM, 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;84:1-19, 2008
54. Evans HJ. Actions of radiations on human chromosomes. Physics in medicine and biology;17:1-13, 1972
55. Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America;83:2934-2938, 1986
56. Duker NJ. Chromosome breakage syndromes and cancer. American journal of medical genetics;115:125-129, 2002
57. 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;111:385-405, 1987
58. Frankenberg-Schwager M. Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells in vitro by ionizing radiation. Radiotherapy and oncology;14:307-320, 1989
59. 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;100:5057-5062, 2003
60. Granzotto A, Benadjaoud MA, Vogin G, Devic C, Ferlazzo ML, Bodgi L, Pereira S, Sonzogni L, Forcheron F, Viau M, Etaix A, Malek K, Mengue-Bindjeme L, Escoffier C, Rouvet I, Zabot MT, Joubert A, Vincent A, Venezia ND, Bourguignon M, Canat EP, d'Hombres A, Thebaud E, Orbach D, Stoppa-Lyonnet D, Radji A, Dore E, Pointreau Y, Bourgier C, Leblond P, Defachelles AS, Lervat C, Guey S, Feuvret L, Gilsoul F, Berger C, Moncharmont C, de Laroche G, Moreau-Claeys MV, Chavaudra N, Combemale P, Biston MC, Malet C, Martel-Lafay I, Laude C, Hau-Desbat NH, Zioueche A, Tanguy R, Sunyach MP, Racadot S, Pommier P, Claude L, Baleydier F, Fleury B, de Crevoisier R, Simon JM, Verrelle P, Peiffert D, Belkacemi Y, Bourhis J, Lartigau E, Carrie C, De Vathaire F, Eschwege F, Puisieux A, Lagrange JL, Balosso J, Foray N. Influence of nucleoshuttling of the atm protein in the healthy tissues response to radiation therapy: Toward a molecular classification of human radiosensitivity. International journal of radiation oncology, biology, physics;94:450-460, 2016
61. 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;83:543-549, 2007
62. Martin NT, Nahas SA, Tunuguntla R, Fike F, Gatti RA. Assessing 'radiosensitivity' with kinetic profiles of gamma-h2ax, 53bp1 and brca1 foci. Radiotherapy and oncology;101:35-38, 2011
63. Werbrouck J, De Ruyck K, Beels L, Vral A, Van Eijkeren M, De Neve W, Thierens H. Prediction of late normal tissue complications in rt treated gynaecological cancer patients: Potential of the gamma-h2ax foci assay and association with chromosomal radiosensitivity. Oncology reports;23:571-578, 2010
64. Bodgi L, Foray N. The nucleo-shuttling of the atm protein as a basis for a novel theory of radiation response: Resolution of the linear-quadratic model. International journal of radiation biology;92:117-131, 2016
65. Ferlazzo ML, Foray N. Huntington disease: A disease of DNA methylation or DNA breaks? The American journal of pathology;186:1750-1753, 2016

Legend to figures

Figure 1: Theory of the ATM nucleo-shuttling. Human radiosensitivity is shared in 3 groups. The group I gathers individuals with fast ATM nucleo-shuttling. The group II gathers individuals suffering from mutations of X proteins that are over-expressed and that delay ATM monomers by sequestrating them in cytoplasm. The group III gathers hyper-radiosensitive individuals who suffered from gross DSB repair defects (e.g. homozygous ATM mutations).

REVUE C

Cancer/Radiothérapie 20 (2016) 217–225

Disponible en ligne sur ScienceDirect www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France EM|consulte www.em-consulte.com

Mise au point

Effets de répétitions de doses d'irradiation et réparation de l'ADN : importance du facteur individuel et de l'intervalle de temps entre les doses

Repeated radiation dose effect and DNA repair: Importance of the individual factor and the time interval between the doses

M. Viau[a], A.-F. Perez[a], L. Bodgi[a], C. Devic[a], A. Granzotto[a], M.L. Ferlazzo[a], M. Bourguignon[b], A. Puisieux[a], T. Lacornerie[c], É. Lartigau[c], J.-L. Lagrange[d], N. Foray[a,*]

[a] *Inserm, UMR1052, centre de recherches en cancérologie de Lyon, 28, rue Laennec, 69008 Lyon, France*
[b] *Institut de radioprotection et sûreté nucléaire, BP 17, 92260 Fontenay-aux-Roses, France*
[c] *Département de radiothérapie, centre Oscar-Lambret, ONCOLille, université de Lille, 3, rue Frédéric-Combemale, 59000 Lille, France*
[d] *Département de radiothérapie, CHU Henri-Mondor, 51, avenue du Maréchal-de-Lattre-de-Tassigny, 94010 Créteil, France*

INFO ARTICLE

Historique de l'article :
Reçu le 9 mars 2015
Reçu sous la forme révisée le 9 mai 2015
Accepté le 12 mai 2015

Mots clés :
Répétition de doses
Fractionnement
Réparation de l'ADN
Radiosensibilité
Cassures double-brin

RÉSUMÉ

L'effet du fractionnement de la dose d'irradiation est une question récurrente qui reste globalement irrésolue car aucun modèle ne permet aujourd'hui de déduire l'effet clinique par la seule donnée de la dose cumulée et des caractéristiques radiobiologiques des tissus irradiés. Cette question importante est abordée différemment en radioprotection, radiothérapie, radiologie ou épidémiologie. Une meilleure compréhension de la réponse moléculaire aux radiations rend aujourd'hui possible une approche nouvelle pour identifier les paramètres qui conditionnent l'effet du fractionnement. En particulier, l'intervalle de temps entre les doses apparaît comme un facteur essentiel puisqu'il permettra, ou non, la réparation de certains dommages radio-induits de l'ADN comme les dommages de bases, les cassures simple-brin ou les cassures double-brin dont les rythmes de réparation sont respectivement de l'ordre de la seconde, de la minute ou de l'heure : l'effet de fractionnement variera alors suivant les statuts fonctionnels de ces voies de réparation, que ce soit pour les tissus sains comme pour les tumeurs.
© 2016 Société française de radiothérapie oncologique (SFRO). Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Keywords:
Repeated doses
Fractionation
DNA repair
Radiosensitivity
DNA double-strand breaks

ABSTRACT

The dose fractionation effect is a recurrent question of radiation biology research that remains unsolved since no model predicts the clinical effect only with the cumulated dose and the radiobiology of irradiated tissues. Such an important question is differentially answered in radioprotection, radiotherapy, radiology or epidemiology. A better understanding of the molecular response to radiation makes possible today a novel approach to identify the parameters that condition the fractionation effect. Particularly, the time between doses appears to be a key factor since it will permit, or not, the repair of certain radiation-induced DNA damages whose repair rates are of the order of seconds, minutes or hours: the fractionation effect will therefore vary according to the functionality of the different repair pathways, whatever for tumor or normal tissues.
© 2016 Société française de radiothérapie oncologique (SFRO). Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

La question de la répétition des expositions aux radiations est née avec la découverte des rayons X et la théorie parasitaire du

* Auteur correspondant.
Adresse e-mail : nicolas.foray@inserm.fr (N. Foray).

http://dx.doi.org/10.1016/j.canrad.2015.05.035
1278-3218/© 2016 Société française de radiothérapie oncologique (SFRO). Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

cancer. En effet, quelques mois après la découverte de Roentgen, Victor Despeignes, hygiéniste et pasteurien convaincu, pensait que pour circonscrire le cancer, il fallait procéder comme pour la tuberculose ou la rage, en injectant, « de façon répétée », un « vaccin ». Cette approche a été d'autant plus facilement mise en pratique, que, médecin d'un canton agricole, forcé à visiter ses malades de fermes en fermes pendant la journée, il ne pouvait appliquer quotidiennement les rayons X à son voisin souffrant d'un cancer de l'estomac[1] que le matin et le soir, au retour de ses visites [1]. Ainsi justifiée par une argumentation qui s'avéra erronée, la répétition des doses fut ensuite consacrée par Claudius Regaud dès 1908 en l'expliquant cette fois par la nécessité d'épargner les tissus sains. Cette approche dite « française » s'opposait à la méthode dite « allemande » qui défendait une dose unique massive. C'est seulement après la première guerre mondiale avec Coutard et Del Regato que Claudius Regaud a codifié le fractionnement en délivrant chaque jour la dose maximale que les irradiateurs de l'époque pouvaient techniquement produire [2].

Encore aujourd'hui, on peut constater qu'en radiothérapie, pour certains examens de radiodiagnostic, mais aussi dans le cadre d'expositions environnementales et professionnelles, les doses de radiation sont rarement délivrées en une seule fois mais plutôt répétées à des intervalles de temps, réguliers ou non. Cette variété d'expositions aux radiations pose de nombreuses questions qui peuvent se résumer ainsi :

- expositions au travail : pour les experts en radioprotection, dans le cadre du calcul des doses équivalentes et efficaces exprimées en sievert, l'effet causé par des doses répétées est considéré comme identique à celui causé par la somme des doses délivrées en une seule fois. Mais l'est-il vraiment ? Les seuils de risque de cancer (100 et 200 mSv pour les leucémies et les tumeurs solides), déduits des données d'Hiroshima (irradiation quasi-instantanée), restent-ils les mêmes quand ces expositions sont étalées dans le temps ? [3,4]. Comment recalculer les doses-seuils de risque en fonction de l'étalement ?
- radiothérapie : l'étude des effets liés au fractionnement, à l'étalement et au cumul de dose date, comme on l'a dit plus haut, du début du XX^{e} siècle [2]. Cette question est d'autant plus d'actualité avec le retour à l'hypofractionnement pour les cancers prostatiques [5] ou avec l'utilisation des modalités thérapeutiques innovantes comme le Cyberknife® utilisant de très nombreux micro-faisceaux par traitement (> 150) et plus largement pour toute la radiothérapie stéréotaxique [6]. Ainsi, l'effet radiobiologique sur les tumeurs ou les tissus sains est-il le même quand une même dose est délivrée en différentes fractions espacées d'intervalles de temps allant de la seconde à la journée ?
- radiodiagnostic : pour les radiologues, la question de la répétition des doses se pose au bloc opératoire, en radioscopie, mais aussi à travers la répétition de clichés mammographiques. Le risque potentiel de cancer radio-induit lié à la répétition de clichés est-il prédit par la dose cumulée [7,8] ?

D'un point de vue radiobiologique, à travers les courbes de survie clonogénique et le modèle linéaire-quadratique, l'effet du fractionnement de doses de l'ordre du gray et d'intervalles de temps entre les doses de l'ordre de la journée est bien connu et est représentatif du principe de Regaud : « épargner les tissus sains en fractionnant la dose » (Fig. 1) [9]. La Fig. 1A suggère que l'effet de fractionnement serait d'autant plus grand que la courbure (quantifiée par le paramètre β) serait forte : ce sont donc les cellules de radiosensibilité intermédiaire (α moyen et β fort) qui montrent l'effet de fractionnement le plus marqué, illustrant ainsi l'importance de l'effet individuel dans la réponse aux expositions répétées. L'étude des courbes de survie clonogénique issues d'irradiations fractionnées ou non fractionnées est indissociablement liée aux notions de lésions potentiellement létales et sublétales, hypothèses émises entre 1970 et 1990. Les lésions potentiellement létales sont généralement définies comme des lésions qui sont réparables mais qui peuvent devenir létales si elles ne sont pas réparées. Favoriser la prolifération après irradiation accélèrerait le processus de mort cellulaire. À l'inverse, retarder un ré-ensemencement de cellules irradiées réduirait le nombre de lésions potentiellement létales et radioprotègerait in vitro. La réparation des lésions potentiellement létales serait plutôt liée au paramètre α de la courbe de survie [10]. Le terme lésions potentiellement létales est généralement utilisé pour les doses uniques. Les lésions sublétales ont été historiquement définies comme des lésions qui ne peuvent, individuellement, causer la mort cellulaire. En revanche, l'accumulation de lésions sublétales, notamment provoquée par une répétition de dose contribue à radiosensibiliser. Les lésions sublétales seraient plutôt liées au paramètre β de la courbe de survie [11,12]. Ces deux notions sont finalement restées assez éloignées des explications mécanistiques. De plus, en 1989, en faisant varier le délai d'ensemencement après irradiation ainsi que le temps entre deux doses, Reddy et Lange ont montré que lésions potentiellement létales et lésions sublétales étaient en fait des lésions de même nature, probablement des cassures de l'ADN [13].

Aujourd'hui, la dynamique des événements moléculaires et cellulaires précoces est mieux documentée. Avec les techniques d'immunofluorescence, ces événements ont été notamment mis en lumière par l'analyse microscopique résolue dans le temps du recrutement de protéines (foci) aux sites de dommages induits par un impact laser ou par des micro-irradiations. Citons les protéines impliquées dans la voie du BER (PARP-1, XRCC1, PCNA. . .) mais également des facteurs de remodelage de la chromatine, tels ALC-1 [14,15]. Grâce à ces techniques, des données récentes de la signalisation des dommages radio-induits de l'ADN montrent qu'une meilleure compréhension des effets de répétitions de dose est à notre portée. Dans cette revue, nous avons tenté de mieux identifier les paramètres-clés des phénomènes de répétitions de dose en s'efforçant de se focaliser sur les cellules humaines et les protocoles d'irradiation réalistes.

2. Répétition de fortes doses

2.1. Événements précoces radio-induits

Environ 10^{-18} à 10^{-12} s après irradiation, les rayons X ou gamma produisent des microdépôts d'énergie aléatoirement répartis dans la matière. De 10^{-12} à 1 s, les ionisations induites par les microdépôts d'énergie entraînent la formation de certaines espèces chimiques à fort pouvoir oxydant (par exemple : radicaux hydroxyles $OH^{\bullet}$, super-oxydes O_2^{-}) mais à durée de vie relativement limitée. L'un des produits de la radiolyse de l'eau, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (eau oxygénée), est capable de produire des dommages comme la 8-oxoguanine et casser l'ADN, notamment pour les cellules radiosensibles [16]. Le peroxyde d'hydrogène est ainsi directement ou indirectement à l'origine de la formation de nombreux dommages de l'ADN : 1 Gy de rayons X ou de rayons gamma produit simultanément environ 10 000 modifications de bases, 1000 cassures simple-brin et 40 cassures double-brin par cellule humaine diploïde (Fig. 2) [17]. Les phénomènes de radiolyse de l'eau obéissent à des lois mathématiques bien caractérisées et peuvent être raisonnablement considérés comme cumulatifs : en termes de nombre de dommages de l'ADN produits, une répétition de doses espacées d'un intervalle inférieur à la seconde peut donc, à

[1] En fait, il s'agissait probablement d'un lymphome [1].

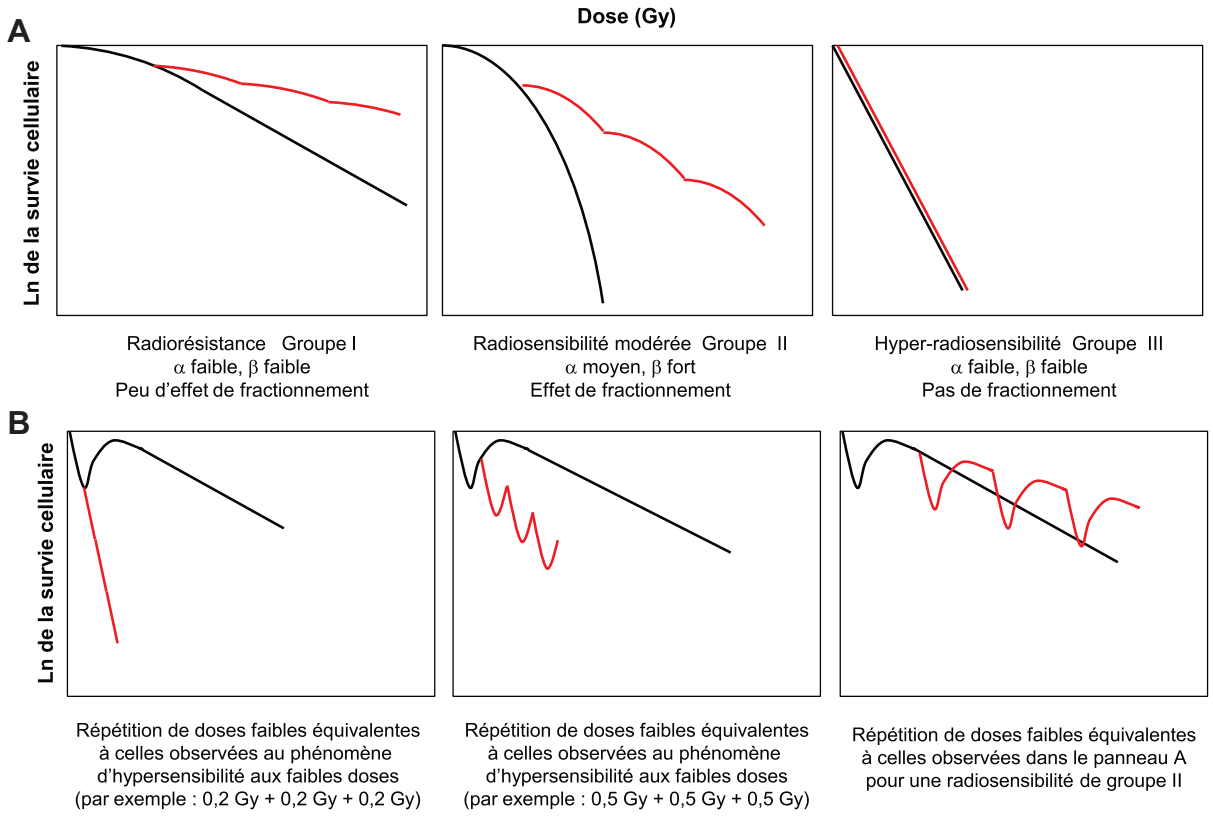


Fig. 1. Répétitions de doses d'irradiation et réparation de l'ADN. A. Effet du fractionnement de fortes doses de radiation (courbes rouges) en fonction de la radiosensibilité intrinsèque (courbes noires) des patients de groupe I (patients radiorésistants), II (patients à radiosensibilité modérée) ou III (patients hyper-radiosensibles). B. Effet du fractionnement de faibles doses de radiation (courbes rouges) selon la dose concernée (courbes noires).

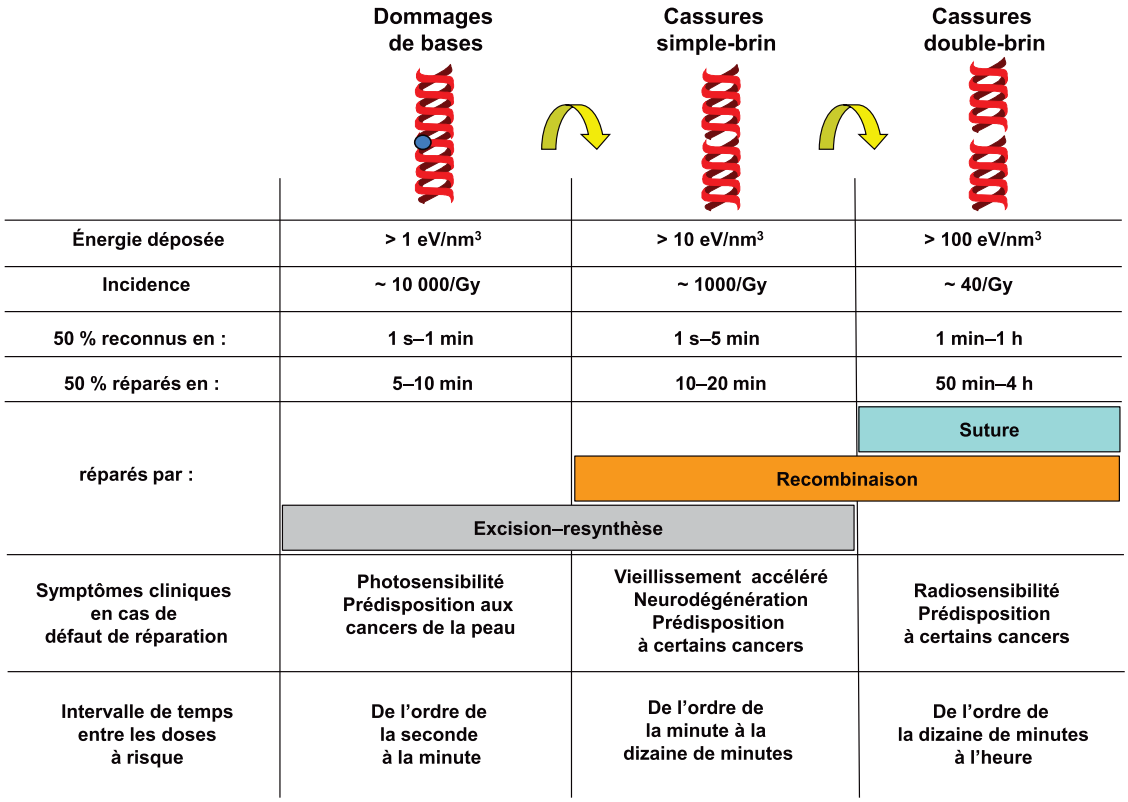


Fig. 2. Différents types de dommages radio-induits de l'ADN avec les microdépôts d'énergie, l'incidence par gray, les demi-vies de reconnaissance et de réparation correspondant, ainsi que les signes cliniques typiques des défauts de réparation et les intervalles de temps entre les doses qui pourraient être concernés.

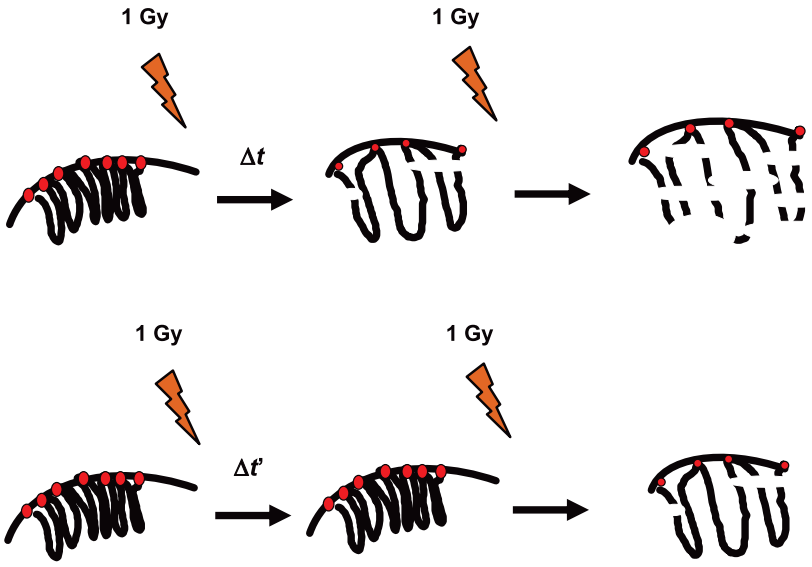


Fig. 3. Répétitions de doses d'irradiation et réparation de l'ADN : effet du fractionnement sur la chromatine. A. Si l'intervalle entre les doses Δt ne permet pas la réparation des cassures de l'ADN, la chromatine plus accessible peut subir un nombre de cassures plus important après la deuxième dose et l'effet de fractionnement peut devenir supra-additif. B. À l'inverse, si l'intervalle $\Delta t'$ permet la réparation complète, l'effet de la deuxième dose sera simplement additif.

l'échelle biologique et clinique, être considérée comme équivalent à la somme des doses délivrées en une seule fois.

2.2. Pour qu'un dommage de l'ADN soit réparé, il faut d'abord qu'il soit reconnu

Pour qu'un dommage de l'ADN soit réparé, il faut que les systèmes cellulaires le reconnaissent en tant que tel. Chaque mode de réparation de chaque type de dommage de l'ADN est ainsi doté de protéines de reconnaissance qui font passer un événement biochimique (par exemple : une cassure) à un événement biologique (par exemple : une phosphorylation) qui déclenchera une cascade d'événements jusqu'à la survie, la mort ou la transformation de la cellule. En particulier, les cassures double-brin radio-induites sont reconnues majoritairement chez les mammifères par le mode de réparation par suture à travers la phosphorylation des histones H2AX par la protéine ATM [18]. Or, la protéine ATM, majoritairement cytoplasmique, doit d'abord migrer vers le noyau et traverser la membrane nucléaire avant de phosphoryler les histones : après une dose de 2 Gy, il faut plusieurs dizaines de secondes pour reconnaître les premières cassures double-brin. Ainsi, les doses répétées espacées de quelques dizaines de secondes à quelques minutes peuvent interférer avec les phénomènes de transit cytonucléaire de ATM et de reconnaissance de dommages de l'ADN. À l'inverse, les dommages de bases stimulent l'activation de protéines qui sont déjà abondantes dans le noyau des cellules ce qui peut expliquer la rapidité avec laquelle ces dommages sont reconnus et réparés. Les effets de répétitions de dose pourraient donc être différents suivant la vitesse avec laquelle les cassures double-brin sont reconnues [19–21].

2.3. Importance de la condensation de la chromatine

Les 3 mètres d'ADN du génome humain sont contenus dans des noyaux cellulaires dont le diamètre est de l'ordre de la dizaine de micromètres : les contraintes de condensation de l'ADN sont donc très fortes. Il est communément admis que les cassures de l'ADN décondensent la chromatine et donc augmentent la distance entre les brins coupés. Plus la dose est élevée, plus l'effet de décondensation est important [22]. Ainsi, lorsque la chromatine est déjà décondensée, une deuxième dose de radiation produit nécessairement un nombre de dommages de l'ADN plus grand (Fig. 3). Une telle supra-additivité est également valable lorsque les cellules sont dans des phases de cycle différentes [23]. Par exemple, il a été montré que des cellules pré-irradiées en G2 ont un excès de cassures double-brin après une seconde dose [24]. Cette explication reste cependant étroitement liée à la vitesse de réparation des dommages de l'ADN et peut devenir très complexe [25,26]. C'est l'objet du prochain chapitre.

2.4. Vitesse de réparation des dommages radio-induits de l'ADN

Les différents types de dommages radio-induits de l'ADN activent des voies de réparation et de signalisation spécifiques. Ainsi, il faut en général quelques minutes, quelques dizaines de minutes et quelques heures pour réparer respectivement toutes les modifications de bases, cassures simple-brin et cassures double-brin (Fig. 2). D'ailleurs, ce constat met à mal l'idée très répandue mais fausse que « la cellule s'arrête dans son cycle pour réparer » : environ 1 heure après irradiation, tous les modifications de bases et les cassures simple-brin et plus de la moitié des cassures double-brin sont déjà réparées alors que les protéines déclenchant le cycle cellulaire ne sont pas encore activées. En effet, les expériences en cytométrie de flux peinent à montrer des arrêts en G1 ou en G2 après quelques minutes d'irradiation. À l'inverse, la cinétique de réparation des cassures double-brin, bien documentée, montre que 40 à 75 % des cassures double-brin sont systématiquement réparées avant que les arrêts du cycle commencent. La phosphorylation des protéines impliquées dans les arrêts du cycle puis la mort cellulaire est en fait conditionnée par la phosphorylation des protéines de reconnaissance et de réparation des cassures double-brin [27]. Par exemple, la phosphorylation des protéines CHK1, CHK2 ou p53 qui déclenche les arrêts du cycle en G2 et G1, respectivement, est observée quelques heures après la phosphorylation de H2AX [27].

En plus des vitesses de réparation spécifiques à chaque dommage radio-induit de l'ADN, le schéma se complique, car suivant la dose et le statut génétique, une répétition de dose peut aboutir à une production différée de dommages additionnels : des modifications de bases peuvent ainsi se transformer en cassures simple-brin, des cassures simple-brin en cassures double-brin et la chromatine peut subir plusieurs condensations et décondensations successives (Fig. 2).

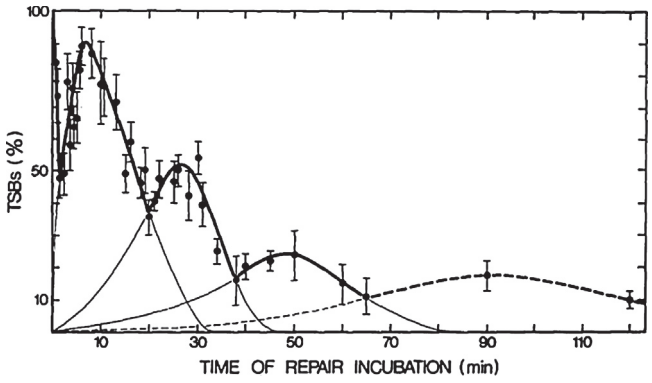


Fig. 4. Nombre de cassures de l'ADN dans les cellules T1 exposées au ^{137}Cs, mesurées par la technique d'élution alkaline, où l'on observe minute par minute les effets de la production de cassures simple-brin primaires, l'excision des dommages de bases et la formation des cassures simple-brin secondaires, la réparation complète des cassures simple-brin et l'apparition des seules cassures double-brin produites secondairement par l'excès des cassures simple-brin.
Reproduit d'après [28] avec autorisation ; ©2016 Taylor and Francis Group. Tous droits réservés.

2.4.1. *Effet de répétition lié aux modifications de bases*

Les modifications de bases ne sont pas réparées en tant que tel mais « excisées » c'est-à-dire transformées en cassures simple-brin. En temps normal, ce processus prend quelques minutes à quelques dizaines de minutes. Ainsi, si l'on étudie dans le temps la formation de toutes les cassures simple-brin radio-induites, deux vagues apparaissent : les cassures simple-brin induites immédiatement et les cassures simple-brin issues de l'excision des modifications de bases produites quelques minutes à quelques dizaines de minutes après l'irradiation [28] (Fig. 2 et 4). En ce qui concerne la chromatine, deux décondensations successives peuvent donc être observées après irradiation. L'application d'une deuxième dose pendant ou entre ces deux décondensations peut donc produire des effets très différents. Chez les patients dont les cellules sont défectueuses dans certaines étapes du mode de réparation des modifications de bases par excision–synthèse, la chromatine reste plus longtemps décompactée, aggravant ainsi la sévérité des dommages causés par la seconde dose. Il est à noter que les statuts génétiques correspondant à un dysfonctionnement de l'excision–synthèse sont généralement associés à une certaine photo- ou chimiosensibilité mais pas à une forte radiosensibilité en dose unique [17,29].

2.4.2. *Effet de répétition lié aux cassures simple-brin*

Des cassures simple-brin rapprochées et en grand nombre peuvent donner naissance à des cassures double-brin. On considère qu'une cassure double-brin est créée si deux cassures simple-brin sur chaque brin sont distantes de moins de 50 pb. Cette situation ne se rencontre après une irradiation unique qu'à des doses de l'ordre du mégagray [30]. Toutefois, une réparation mal contrôlée (appelée hyper-recombinaison) peut produire des cassures simple-brin et des cassures double-brin en nombre considérable sur un intervalle de temps très rapide (de l'ordre de la minute). Le phénomène d'hyper-recombinaison a été systématiquement observé dans les cellules de patients qui montrent une grande instabilité génomique, une forte prédisposition au cancer comme les prédispositions familiales au cancer du sein, l'anémie de Fanconi ou le syndrome de Bloom [31]. Ce phénomène étant très fortement dépendant de la dose, la répétition de doses sur de courts intervalles de temps amplifie l'hyper-recombinaison, la décondensation de la chromatine et donc la production de cassures de l'ADN par les systèmes cellulaires (Fig. 2 et 4). Une telle contribution n'apparaît pas dans la mesure de la dose physique.

2.4.3. *Effet de répétition lié aux cassures double-brin*

Comme on l'a dit plus haut, la moitié des cassures double-brin sont généralement réparées en 1 heure environ pour des témoins radiorésistants. En revanche, la demi-vie de réparation des cassures double-brin chez des patients radiosensibles peut aller jusqu'à 8 heures [20] (Fig. 2). Ainsi, dans le cas d'intervalles de temps entre les doses compris entre 30 minutes et 8 heures, les effets de répétitions de dose pourraient ne pas être simplement additifs mais supra-additifs.

On voit donc ici que la réponse moléculaire aux radiations est une succession alternée de production, de transformation et de réparation de dommages radio-induits. L'application d'une seconde dose pendant ces différentes étapes peut donc en perturber le bon déroulement et produire des effets éventuellement synergiques. La démonstration d'une telle succession d'événements pour une dose unique a été donnée en 1987 par l'équipe du Pr Ludwig Feinendegen (Fig. 4). En étudiant minute par minute le rythme de réparation des cassures simple-brin sur une lignée cellulaire humaine, ces auteurs ont observé plusieurs vagues successives au fur et à mesure du temps de réparation : les cassures simple-brin spontanées, réparées rapidement grâce à l'activation radio-induite de protéines de réparation, les cassures simple-brin radio-induites primaires, les cassures simple-brin secondaires dues à l'excision des modifications de bases, puis les cassures simple-brin représentant la forme dénaturée des cassures double-brin (la technique de détection était en pH alcalin). À ce jour, ce résultat reproduit dans la Fig. 4 constituait une des énigmes de la radiobiologie [28].

2.5. *Vers une définition des statuts génétiques sensibles aux effets de répétitions de dose ?*

Suivant l'intervalle de temps Δt séparant deux doses de radiation, l'effet de répétition de dose dépendrait ainsi de la demi-vie des différents types de dommages de l'ADN. De manière très simplifiée, si la dose est de l'ordre du Gy et Δt est :

- de l'ordre de la seconde, la fonctionnalité de la réparation des modifications de bases est cruciale et pourrait concerner des patients déficients dans la voie d'excision–resynthèse, donc plutôt photosensibles ou sensibles à des drogues chimiothérapiques concernant les modification de bases (par exemple : inhibiteurs de PARP) ;
- de l'ordre de la minute, la fonctionnalité de la réparation des cassures simple-brin est cruciale et pourrait concerner des patients atteints d'hyper-recombinaison, donc plutôt prédisposés génétiquement au cancer ou sensibles à des drogues chimiothérapiques concernant les cassures simple-brin (par exemple : bléomycine, cisplatine) ;
- de l'ordre de l'heure à la dizaine d'heures, la fonctionnalité de la réparation des cassures double-brin est cruciale et pourrait concerner des patients associés à des défauts de réparation des cassures double-brin (donc souffrant de radiosensibilité modérée à forte ou sensibles à drogues chimiothérapiques concernant les cassures double-brin, par exemple : doxorubicine).
- de plus de 24 heures, tous les types de dommages de l'ADN qui devaient être réparés l'ont été : l'effet biologique de répétition de dose pourrait correspondre à la somme des effets obtenus après une dose unique.

Ces premières règles, valables également pour les tumeurs, permettent aujourd'hui d'expliquer des effets spectaculaires de répétitions de dose comme notamment l'effet « W ». À partir d'un accélérateur linéaire d'électrons pouvant délivrer une irradiation pulsée et à l'aide des tests clonogéniques, l'équipe de Vincent Favaudon a mis en évidence en 1996 un effet tétraphasique en W résultant de la succession de deux doses de l'ordre du gray

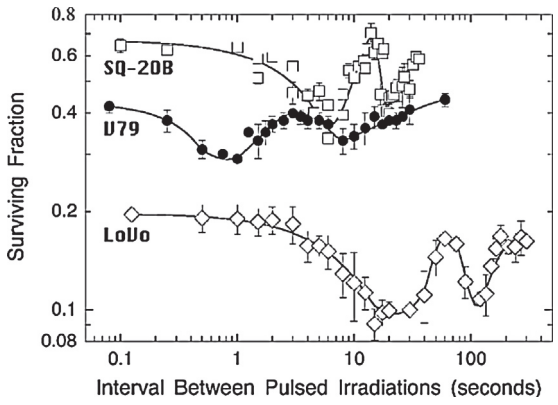


Fig. 5. Répétitions de doses d'irradiation et réparation de l'ADN : variations de la survie clonogénique en fonction de l'intervalle entre les doses sur des lignées de rongeur V79 ou des lignées humaines SQ20B et LoVo recevant une irradiation fractionnée (électrons 3,5 MeV ; 12 Gy/s). Les doses délivrées étaient pour V79 : 1 Gy puis 4 Gy ; SQ20B : 2 Gy puis 4 Gy ; LoVo : 1,5 Gy puis 1,5 Gy.
Reproduit d'après [32] avec autorisation ; ©2016 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

espacées d'intervalles de temps de l'ordre de la seconde à la minute. L'intensité de l'effet dépend fortement de la lignée cellulaire. De plus, le statut de la PARP et l'organisation de la chromatine sembleraient conditionner l'existence ou l'intensité de l'effet W, conformément à nos conclusions évoquées ci-dessus [32,33] (Fig. 5).

L'un des enseignements de ces résultats est que les patients sensibles aux hypofractionnements ne sont pas forcément à rechercher parmi les tableaux les plus sensibles aux radiations en dose unique mais plutôt parmi ceux associés à des réponses intermédiaires ou à des sensibilités à des agents génotoxiques qui induisent d'autres dommages que des cassures double-brin. Une telle conclusion permet de mieux comprendre comment certains syndromes génétiques, tels que la neurofibromatose de type 1 peuvent apparaître radiorésistants à dose unique mais radiosensibles quand un fractionnement de la dose est appliqué [34].

2.6. Comment aller plus loin dans la prédiction des effets de répétitions de dose ?

Dans le cadre d'une grande étude systématique de la radiosensibilité humaine, le groupe de radiobiologie du centre de recherche en cancérologie de Lyon recense depuis plus de 10 ans de nombreux cas de radiosensibilité clinique chez des patients atteints de syndrome génétique connu ou bien ayant montré des réactions précoces ou tardives à la suite d'une radiothérapie (projet Copernic) (Granzotto et al., soumis). Une même approche est appliquée : une biopsie de peau est effectuée par punch dermatologique puis les fibroblastes de peau sont amplifiés en culture. Après une dose unique de 2 Gy, plusieurs marqueurs de la réparation et de la signalisation des dommages de l'ADN sont analysés par immunofluorescence à différents temps post-irradiation. L'analyse d'au moins 200 cas a permis d'aboutir au modèle suivant : la protéine kinase ATM, dont les mutations causent l'ataxie télangiectasie, syndrome associé à la plus forte radiosensibilité humaine, passe du cytoplasme au noyau après irradiation. Une fois dans le noyau, la protéine kinase ATM active la reconnaissance des cassures double-brin qui seront réparées par suture à travers sa phosphorylation de l'histone H2AX (γH2AX) (Fig. 6). En parallèle, la protéine kinase ATM inhibe l'activité nucléasique de MRE11, productrice de cassures double-brin responsables de l'instabilité génomique et de l'hyper-recombinaison [20,21].

En temps normal, le transit cytonucléaire radio-induit d'ATM s'effectue en 10 minutes environ après 2 Gy. L'analyse des différents cas nous a incités à proposer une classification de la radiosensibilité

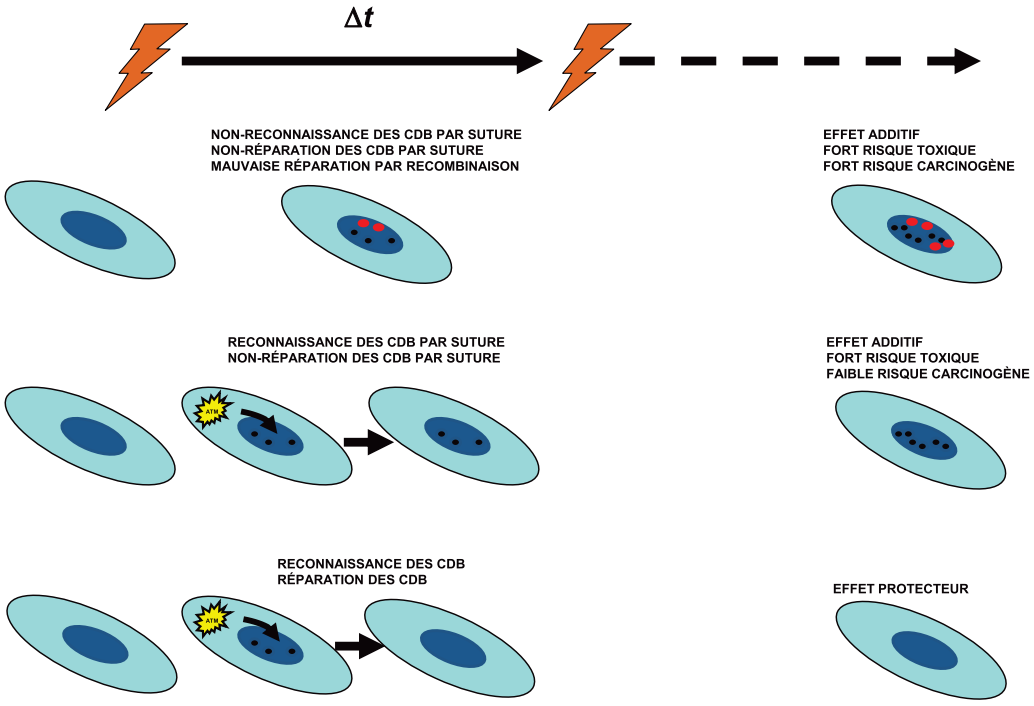


Fig. 6. Répétitions de doses d'irradiation et réparation de l'ADN : effet du fractionnement sur le transit cytonucléaire de la protéine ATM. Si l'intervalle entre les doses Δt ne permet pas le transit d'ATM dans le noyau, les cassures double-brin ne seront pas reconnues par le mode de réparation par suture et peuvent donc être soit non réparées ou mal réparées. Si l'intervalle entre les doses Δt permet le transit d'ATM dans le noyau, la reconnaissance des cassures double-brin par le mode de réparation par suture mais pas leur réparation, la répétition des doses consistera à une accumulation linéaire de cassures double-brin non réparées (cas idéal pour traiter les tumeurs). Enfin, si l'intervalle entre les doses Δt permet le transit d'ATM dans le noyau, la reconnaissance et la réparation des cassures double-brin par suture, aucun effet biologique notable ne devrait être observé à la fin de chaque dose (cas idéal pour les tissus sains). CDB : cassure double-brin.

en trois groupes valable pour les tissus sains comme pour les tumeurs :

- le groupe I rassemble les patients radiorésistants dont les cellules ne montrent pas de retard de transit cytonucléaire d'ATM après irradiation et qui réparent toutes les cassures double-brin par suture ;
- le groupe II rassemble les patients à radiosensibilité modérée et souvent prédisposés au cancer dont les cellules montrent un retard significatif de transit cytonucléaire d'ATM après irradiation (de l'ordre de l'heure après 2 Gy) et un taux de cassures double-brin non réparées différent des témoins radiorésistants ;
- le groupe III rassemble les patients hyper-radiosensibles mutés à l'état homozygote pour ATM ou pour la ligase 4 [20,21] (Fig. 6).

Pour ce qui concerne la sensibilité au fractionnement, les patients du groupe I, bien que radiorésistants, peuvent souffrir d'un dysfonctionnement de l'excision–resynthèse ou d'une chimiosensibilité issue d'une drogue non cassante : un sous-groupe du groupe I pourrait ainsi rassembler des patients qui seraient sensibles à des répétitions de doses espacées de quelques secondes à quelques minutes. Les patients du groupe II quant à eux rentrent typiquement dans la catégorie des personnes dont les cellules montrent de l'hyper-recombinaison avec un risque potentiel de sensibilité à l'hypofractionnement de doses espacées d'intervalles de l'ordre de la minute ou de la dizaine de minutes (Fig. 7). Enfin, pour les patients du groupe III, fortement radiosensibles, l'effet du fractionnement n'est pas mesurable. Ces conclusions montrent encore une fois que les effets des répétitions pourraient concerner des patients dont la réponse serait normale après dose unique ou fractions de doses espacées de 24 heures.

3. Impact des faibles doses dans l'effet du fractionnement

Aux effets de répétitions de doses évoqués dans le chapitre précédent s'ajoutent les effets des faibles doses qui sont généralement non linéairement liés à la dose et fortement dépendants du facteur individuel. À travers la succession des faibles et des fortes doses, sont naturellement concernées les doses diagnostiques de l'imagerie.

3.1. Hypersensibilité aux faibles doses et faibles doses répétées

L'hypersensibilité aux faibles doses est un phénomène non artéfactuel très documenté et mis en évidence historiquement par des tests clonogéniques. Il conduit à un excès d'environ 25 % de létalité cellulaire entre 0,1 et 0,8 Gy sur tout type cellulaire, généralement à fort pouvoir prolifératif [35] (Fig. 1B). Dans cette gamme de doses, le taux de survie est comparable à celui obtenu à des doses dix fois plus fortes. Il semble que ce soit les défauts de réparation des cassures double-brin qui expliquent le mieux ce phénomène [36] : les faibles doses pourraient induire quelques cassures double-brin sans pour autant activer les protéines de la signalisation de la réparation. Les cassures double-brin ne sont alors pas reconnues donc ne sont pas réparées. Pour des doses plus élevées tout en restant faibles, le nombre de cassures double-brin produites est plus grand et les protéines de la signalisation reconnaissent plus de cassures double-brin : plus de cassures double-brin sont réparées, la survie augmente. D'après la Fig. 1B, on voit bien que l'effet de répétition de doses ne sera pas le même suivant la valeur de la dose répétée, l'existence d'un tel phénomène étant lui-même conditionné par le statut génétique.

Récemment, en irradiant de l'épithélium mammaire en conditions mammographiques de dépistage (deux clichés de 2 mGy

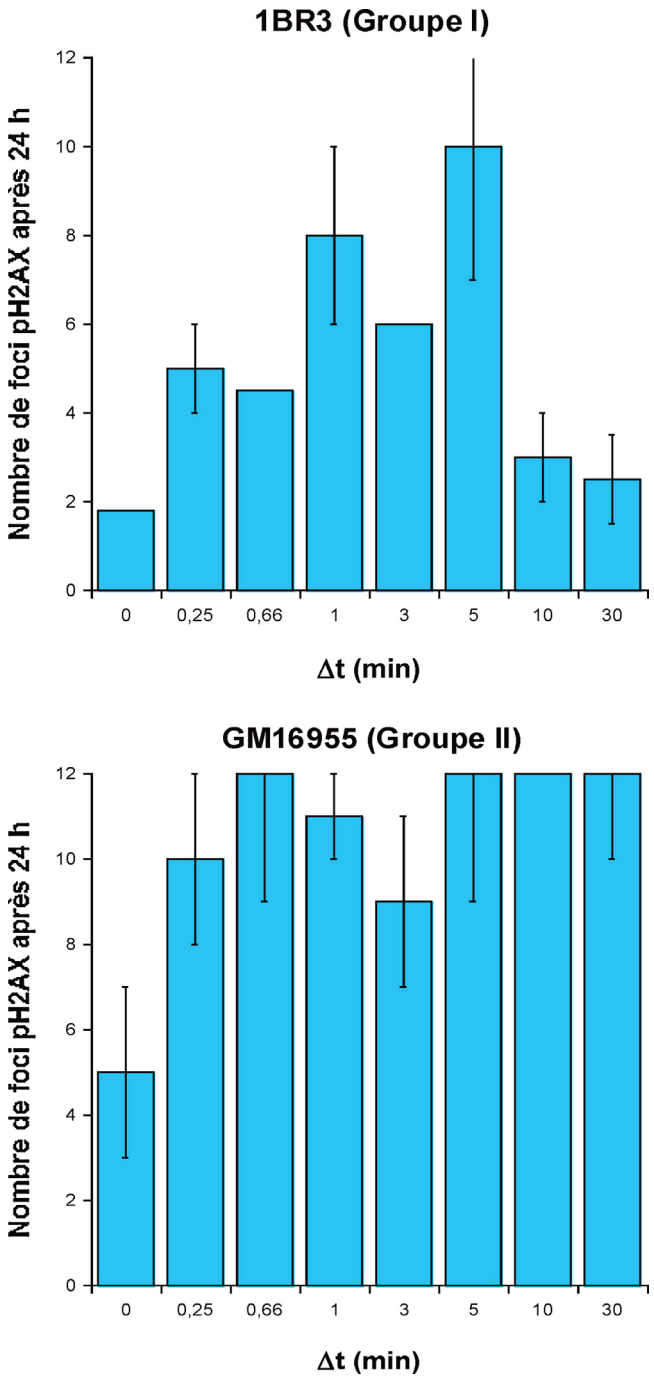


Fig. 7. Répétitions de doses d'irradiation et réparation de l'ADN : nombre de foci pH2AX après 1 Gy suivi de 1 Gy en fonction de l'intervalle de temps entre les doses pour des lignées fibroblastiques humaines non transformées de groupe I ou II.

espacés de 3 minutes), il a été montré que la répétition des doses produit un effet supra-additif avec la production de cassures double-brin après irradiation [7]. Cet effet est d'autant plus fort que les cellules sont issues de patientes à haut risque familial, c'est-à-dire prédisposées à l'instabilité génomique. Des cellules multilésées, portant un nombre de CDB presque 100 fois supérieur au nombre attendu ont été observées à la suite de la répétition de faibles doses [7]. Des observations similaires avaient déjà été effectuées par Regaud en 1908 [37]. Cet effet de répétition est en fait le résultat de deux phénomènes que nous avons appelés LORD et LADI :

- effet LORD (*low and repeated dose*) : le temps entre les deux doses est insuffisant pour que toutes les cassures de l'ADN soient réparées. Les cassures simple-brin et cassures double-brin de la première dose produisant un débobinage de la chromatine, la seconde dose irradie une chromatine plus décondensée qu'avant la première dose : un effet supra-additif dans la production de cassures est inévitable et peut concerner tous les groupes de radiosensibilité ;
- effet LADI (*low dose-induced additional breaks*) : dans le cadre de patients sujets à une hyper-recombinaison, l'induction de dommages stimule un mode de réparation fautif qui rajoute des cassures supplémentaires. Après une deuxième dose, la chromatine débobinée est encore plus accessible aux nucléases qui cassent l'ADN : cet effet supra-additif est massif et concerne plutôt les patients du groupe II.

3.2. *Réponse adaptative : succession d'une faible puis d'une forte dose*

Le terme de réponse adaptative est généralement utilisé pour décrire la diminution de la radiosensibilité ou de la mutagénicité en réponse à une forte dose de l'ordre du gray après avoir préalablement soumis les cellules 4 à 6 heures avant à une première dose faible (0,001 à 100 mGy) [38,39]. La réponse adaptative ne peut être observée que sur des cellules déjà radiosensibles (quand c'est la radiosensibilité qui est mesurée à la fin du traitement) ou sur des cellules déjà transformées ou tumorales (quand c'est la mutagénicité ou le caractère transformant qui sont étudiés). La réponse adaptative n'implique pas que les faibles doses seules soient bénéfiques puisque la seconde dose est plus forte et potentiellement létale ou cancérogène. Ainsi, la réponse adaptative a souvent constitué une source d'erreur d'interprétation à l'origine de l'hypothèse de l'innocuité des faibles doses de radiation : à la lumière des données récentes, on ne peut plus considérer rigoureusement l'hormésis ou la réponse adaptative comme des moyens de défense spécifiques contre des cellules aberrantes qui aboutiraient au cancer puisque ces phénomènes sont principalement observés sur des cellules déjà radiosensibles ou transformées et que, dans le cas d'un rayonnement X ou gamma, toutes les cellules reçoivent la même dose de radiation, même à des doses de l'ordre du nanogray.

4. Conclusions

Depuis les travaux pionniers de Claudius Regaud, le fractionnement de la dose et son étalement dans le temps restent l'une des meilleures approches pour épargner les tissus sains. Toutefois, la prédiction des effets radiobiologiques de l'hypo- ou de l'hyperfractionnement s'est heurtée depuis des décennies à la méconnaissance des mécanismes moléculaires et cellulaires de la réponse aux radiations. Aujourd'hui, certaines avancées de radiobiologie suggèrent que l'effet de répétition de dose peut être déduit du statut génétique fonctionnel des tissus sains ou de la tumeur mais aussi de l'intervalle entre les doses. Des études radiobiologiques effectuées en conditions exactes d'irradiation fractionnées (sur les postes de travail, sur les irradiateurs de radiothérapie et sur les appareils de radiodiagnostic) sont donc à mener pour mieux prévenir les réactions indésirables et augmenter l'index thérapeutique. La prédiction de tels effets, nocifs ou radioprotecteurs, est aujourd'hui à notre portée.

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

[1] Foray N. Victor Despeignes (1866–1937) : comment un hygiéniste devint le premier radiothérapeute de l'Histoire. Cancer Radiother 2013;17:244–54.
[2] Foray N. Claudius Regaud (1870–1940) : relecture des archives d'un pionnier de la radiobiologie et de la radiothérapie. Cancer Radiother 2012;16:315–21.
[3] Anon. New York: UNSCEAR; 2000.
[4] Anon [Annex D] Report of the United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR). Sources and effects of ionizing radiation. New York: UNSCEAR; 2011.
[5] Cosset JM, Mornex F, Eschwège F. Hypofractionnement en radiothérapie : l'éternel retour. Cancer Radiother 2013;17:355–62.
[6] Canazza A, De Grazia U, Fumagalli L, Brait L, Ghielmetti F, Fariselli L, et al. In vitro effects of Cyberknife-driven intermittent irradiation on glioblastoma cell lines. Neurol Sci 2011;32:579–88.
[7] Colin C, Devic C, Noël A, Rabilloud M, Zabot M-T, Pinet-Isaac S, et al. DNA double-strand breaks induced by mammographic screening procedures in human mammary epithelial cells. Int J Radiat Biol 2011;87:1103–12.
[8] Colin C, Foray N. DNA damage induced by mammography in high family risk patients: only one single view in screening. Breast 2012;21:409–10.
[9] Steel GG. Basic clinical radiobiology. 3rd ed. Londres: Arnold; 2002.
[10] Iliakis G. Radiation-induced potentially lethal damage: DNA lesions susceptible to fixation. Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med 1988;53:541–84.
[11] Hall EJ, Giacca AJ. Radiobiology for the radiologist. Philadelphia, PA: Lippincott Wilkins & Williams; 2006.
[12] Tubiana M. Radiobiologie, radiothérapie et radioprotection. Bases fondamentales. Paris: Hermann/Médecine; 2008.
[13] Reddy NM, Lange CS. Similarities in the repair kinetics of sublethal and potentially lethal X-ray damage in log phase Chinese hamster V79 cells. Int J Radiat Biol 1989;56:239–51.
[14] Mortusewicz O, Ame JC, Schreiber V, Leonhardt H. Feedback-regulated poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1 is required for rapid response to DNA damage in living cells. Nucl Ac Res 2007;35:7665–75.
[15] Godon C, Cordelieres FP, Biard D, Giocanti N, Megnin-Chanet F, Hall J, et al. PARP inhibition versus PARP-1 silencing: different outcomes in terms of single-strand break repair and radiation susceptibility. Nucl Ac Res 2008;36:4454–64.
[16] Frankenberg-Schwager M, Becker M, Garg I, Pralle E, Wolf H, Frankenberg D. The role of nonhomologous DNA end joining, conservative homologous recombination, and single-strand annealing in the cell cycle-dependent repair of DNA double-strand breaks induced by H(2)O(2) in mammalian cells. Radiat Res 2008;170:784–93.
[17] Joubert A, Foray N. Radiosensibilité intrinsèque et cassures double-brin de l'ADN dans les cellules humaines. Cancer Radiother 2013;11:129–42.
[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;100:5057–62.
[19] Thomas C, Martin J, Devic C, Diserbo M, Thariat J, Foray N. Impact of dose-rate on the low-dose hyper-radiosensitivity and induced radioresistance (HRS/IRR) response. Int J Radiat Biol 2013;89:813–22.
[20] Bodgi L, Granzotto A, Devic C, Vogin G, Lesne A, Bottollier-Depois JF, et al. A single formula to describe radiation-induced protein relocalization: towards a mathematical definition of individual radiosensitivity. J Theor Biol 2013;333:135–45.
[21] Ferlazzo ML, Sonzogni L, Granzotto A, Bodgi L, Lartin O, Devic C, et al. Mutations of the Huntington's disease protein impact on the ATM-dependent signaling and repair pathways of the radiation-induced DNA double-strand breaks: corrective effect of statins and bisphosphonates. Mol Neurobiol 2014;49:1200–11.
[22] Roti Roti JL, Wright WD. Visualization of DNA loops in nucleoids from HeLa cells: assays for DNA damage repair. Cytometry 1987;8:461–7.
[23] Iliakis G. The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. Bioessays 1991;13:641–8.
[24] Yu YQ, Giocanti N, Averbeck D, Megnin-Chanet F, Favaudon V. Radiation-induced arrest of cells in G2 phase elicits hypersensitivity to DNA double-strand break inducers and an altered pattern of DNA cleavage upon re-irradiation. Int J Radiat Biol 2000;76:901–12.
[25] 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;73:373–82.
[26] Lavelle C, Foray N. Chromatin structure and radiation-induced DNA damage: from structural biology to radiobiology. Int J Biochem Cell Biol 2014;49:84–97.
[27] Foray N, Marot D, Gabriel A, Randrianarison V, Carr AM, Perricaudet M, et al. A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. EMBO J 2003;22:2860–71.
[28] Schneeweiss FH, Tisljar-Lentulis G, Haustein K, Feinendegen LE. 'Periodical' pattern of kinetics of DNA strand break repair following gamma-irradiation of human T1-cells. Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med 1987;52:491–3.
[29] Deschavanne PJ, Fertil B. A review of human cell radiosensitivity in vitro. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1996;34:251–66.
[30] Goodhead DT. The initial physical damage produced by ionizing radiations. Int J Radiat Biol 1989;56:623–34.
[31] Foray N, Verrelle P. Réparations et réparatoses : entre modèles moléculaires et réalité clinique. Bull Cancer 2011;98:257–75.
[32] Ponette V, Giocanti N, Tourbez H, Balosso J, Hennequin C, Favaudon V. Pulse exposure to ionizing radiation elicits rapid changes in cellular radiosensitivity. C R Acad Sci III 1996;319:505–9.

[33] Ponette V, Le Péchoux C, Deniaud-Alexandre E, Fernet M, Giocanti N, Tourbez H, et al. Hyperfast, early cell response to ionizing radiation. Int J Radiat Biol 2000;76:1233–43.
[34] Hannan MA, Sackey K, Sigut D. Cellular radiosensitivity of patients with different types of neurofibromatosis. Cancer Genet Cytogenet 1993;66:120–5.
[35] Marples B, Collis SJ. Low-dose hyper-radiosensitivity: past, present, and future. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2008;70:1310–8.
[36] Thomas C, Charrier J, Massart C, Cherel M, Fertil B, Barbet J, et al. Low-dose hyper-radiosensitivity of progressive and regressive cells isolated from a rat colon tumour: impact of DNA repair. Int J Radiat Biol 2008;84:533–48.
[37] Vogin G, Foray N. The law of Bergonie and Tribondeau: a nice formula for a first approximation. Int J Radiat Biol 2013;89:2–8.
[38] Olivieri G, Bodycote J, Wolff S. Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. Science 1984;223:594–7.
[39] Raaphorst GP, Boyden S. Adaptive response and its variation in human normal and tumour cells. Int J Radiat Biol 1999;75:865–73.