



**HAL**  
open science

# Cassures double-brin de l'ADN et influence du facteur individuel dans la réponse aux faibles doses de radiation : cas particulier des examens par scanner

Clément Devic

► **To cite this version:**

Clément Devic. Cassures double-brin de l'ADN et influence du facteur individuel dans la réponse aux faibles doses de radiation : cas particulier des examens par scanner. Biologie cellulaire. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1094 . tel-03278539

**HAL Id: tel-03278539**

**<https://theses.hal.science/tel-03278539v1>**

Submitted on 5 Jul 2021

**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.



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

**Ecole Doctorale N° 340**  
**BIOLOGIE MOLECULAIRE, INTEGRATIVE ET CELLULAIRE (BMIC)**

**Spécialité de doctorat :**  
**Discipline :** Radiobiologie

Soutenue publiquement le 17/04/2020, par :  
**Clément Devic**

---

**Cassures double-brin de l'ADN et  
influence du facteur individuel dans la  
réponse aux faibles doses de radiation :  
cas particulier des examens par scanner**

---

Devant le jury composé de :

Pr Philippe DOUEK, HCL/Université Lyon 1/INSERM CREATIS U144  
Pr Monique COURTADE-SAIDI, Université Toulouse 3/INSERM UMR137  
Pr Hubert DUCOU LE POINTE, AP-HP/Université Sorbonne  
Dr Frédérique MEGNIN-CHANET INSERM U1196/UMR9187 Institut Curie  
Dr Nicolas Foray INSERM UA8 Radiations : Défense Santé Environnement  
Dr Mélodie MUNIER, Responsable R&D Fibermetrix

Président  
Rapporteuse  
Rapporteur  
Examinatrice  
Directeur de thèse  
Co-encadrante de thèse

## **Université Claude Bernard – LYON 1**

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	
Directeur Général des Services	M. Damien VERHAEGHE

### **COMPOSANTES SANTE**

Faculté de Médecine Lyon-Est – Claude Bernard	Doyen : M. Gilles RODE
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud Charles. Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
UFR d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. Xavier PERROT
Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT

### **COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE**

UFR Biosciences	Directrice : Mme Kathrin GIESELER
Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
UFR - Faculté des Sciences	Administrateur provisoire : M. Bruno ANDRIOLETTI
UFR (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Ecole Polytechnique Universitaire Lyon 1	Directeur : Emmanuel PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
ESPE	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON

## Table des matières

<b>1 Introduction</b>	<b>1</b>
<b>2 Rappels bibliographiques</b>	<b>3</b>
2.1 Principes généraux et technologie du scanner	3
2.1.1 Historique et définition	3
2.1.1.1 Les débuts de la scanographie clinique	3
2.1.1.2 La guerre des coupes	8
2.1.1.3 Scanographie double énergie	8
2.1.1.4 Reconstruction itérative	11
2.2 Doses et principes de radioprotection liés au scanner	13
2.2.1 Rappels des bases réglementaires	13
2.2.2 Généralités sur la dose et les indicateurs spécifiques pour le scanner	14
2.2.2.1 Dose absorbée et ses indicateurs spécifiques pour le scanner	14
2.2.2.2 Dose efficace et ses liens avec les indicateurs précédents	17
2.2.2.3 Exemples de doses délivrées lors d'examens scanographiques	21
2.2.3 Évolution de l'utilisation du scanner et ses conséquences	21
2.2.4 Justification, optimisation et limitation de dose et augmentation des expositions liées au scanner	24
2.2.4.1 Justification de la dose et scanner	24
2.2.4.2 Optimisation de la dose et scanner	26
2.2.4.3 Limitation de la dose en scanner	28
2.3 Données épidémiologiques et modèles de risque	30
2.3.1 Les différents modèles d'évaluation du risque radioinduit	31
2.3.2 Données épidémiologiques	33
2.3.2.1 Évaluation du risque sur la cohorte des survivants d'Hiroshima et Nagasaki	33
2.3.2.2 Évaluation du risque sur des cohortes de patients en scanographie	33
2.3.2.3 Limite de la portée des études épidémiologiques publiées	37
2.3.2.3.1 Temps de suivi	37
2.3.2.3.2 Recueil des doses	37
2.3.2.3.3 Indications cliniques	38
2.3.2.3.4 Le projet EPI-CT : une étude importante très attendue	39
2.3.2.4 Importance de l'âge à l'exposition	39
2.4 Rappels de radiobiologie	44
2.4.1 Des dépôts d'énergie aux dommages de l'ADN	44
2.4.1.1 Échelle des temps en radiobiologie	44

2.4.1.2	Evénements physiques radioinduits	45
2.4.1.2.1	Principes généraux	45
2.4.1.2.2	Microdépôts d'énergie et notion de dose	46
2.4.1.2.3	Microdépôts d'énergie et méthode de Monte-Carlo	46
2.4.1.2.4	Structure du trajet d'une particule	47
2.4.1.3	Evénements chimiques et enzymatiques	47
2.4.1.3.1	Effets directs ou indirects	47
2.4.1.3.2	La radiolyse de l'eau	48
2.4.1.4	Les différents dommages radioinduits de l'ADN	49
2.4.1.4.1	L'ADN et ses différents degrés de compaction	49
2.4.1.4.2	Dépôts d'énergie et sévérité des dommages	51
2.4.1.4.3	Interaction entre les dommages de l'ADN	53
2.4.2	Cassures de l'ADN et des chromosomes	54
2.4.2.1	Prédominance des CDB dans la létalité cellulaire	54
2.4.2.2	Techniques de mesure des CDB	54
2.4.2.2.1	Généralités sur les techniques de mesure de CDB	54
2.4.2.2.2	Immunofluorescence	56
2.4.2.3	Induction des CDB	57
2.4.2.4	Reconnaissance et signalisation des CDB	57
2.4.2.5	Réparation des CDB	59
2.4.2.5.1	« Le modèle de la chaussette	59
2.4.2.5.2	La réparation par recombinaison	60
2.4.2.5.3	La réparation par suture	62
2.4.2.5.4	Le paradigme actuel de la réparation des CDB	64
2.4.2.6	Rôle de ATM dans la réponse aux dommages	65
2.4.2.6.1	Généralités sur ATM	65
2.4.2.6.2	Localisation d'ATM dans les cellules humaines	65
2.4.3	La survie cellulaire	67
2.4.3.1	La mort radiobiologique	67
2.4.3.2	La technique de référence en radiobiologie	68
2.4.3.3	Les trois types de morts de cellulaire	69
2.4.4	L'approche générale du laboratoire d'accueil	71
2.4.4.1	Justification des choix techniques	71
2.4.4.1.1	Choix des tests fonctionnels de la réparation des CDB	71
2.4.4.1.2	Choix des modèles cellulaires	73
2.4.5	La radiosensibilité individuelle	75
2.4.5.1	Radiosensibilité : histoire d'un mot	75
2.4.5.2	Réaction tissulaire ou cancer radioinduit ?	76
2.4.5.3	Radiosensibilité individuelle : 100 ans d'évidence	77
2.4.5.4	Radiosensibilité : son existence et son importance	78

2.4.5.5 Radiosensibilité ou erreur de dosimétrie ?	81
2.4.5.6 Réparatoses et syndromes radiosensibles	82
2.4.5.6.1 Maladies de la signalisation ATM/ATR	82
2.4.5.6.2 Maladies de la réparation par suture	84
2.4.5.6.2.1 Mutations de Ku et DNA-PKcs	84
2.4.5.6.2.2 Mutations de Ligase IV	84
2.4.5.6.2.3 Mutations de Artémis, Cernnunos et 53BP1	84
2.4.5.6.3 Maladies de la recombinaison non-homologue	85
2.4.5.6.3.1 Mutations de NBS1 : syndrome de Nijmegen	85
2.4.5.6.3.2 Mutations de MRE11	86
2.4.5.6.3.3 Mutations de Rad50	86
2.4.5.6.4 Les syndromes progéroïdes	87
2.4.5.6.5 Maladies des protéines-supports	87
2.4.5.6.5.1 Mutations de BRCA1 et BRCA2	87
2.4.5.6.5.2 Mutations des gènes FANC	88
2.4.5.6.6 Les autres syndromes liés à une radiosensibilité	88
2.4.5.6.7 Syndromes radiosensibles non-réparatoses	89
2.4.5.6.8 Syndromes radiosensibles et risque de cancer	89
2.4.6 Les acquis du laboratoire d'accueil depuis 2003	92
2.4.6.1 Une première corrélation quantitative entre radiotoxicité et CDB non réparées.	92
2.4.6.2 La genèse du modèle du transit cyto-nucléaire d'ATM	93
2.4.6.3 Les principes généraux du modèle du transit cyto-nucléaire d'ATM	94
2.4.6.4 Les applications du transit cytonucléaire d'ATM	96
2.4.6.5 Synthèse	97
2.4.7 Spécificités des faibles doses	98
2.4.7.1 Cassures double-brin et faibles	98
2.4.7.2 L'hormésis et la réponse adaptative	99
2.4.7.2.1 Réponse adaptative	103
2.4.7.2.1.1 La RA à travers l'histoire : Une pléthore de protocoles différents	103
2.4.7.2.1.2 Influence des valeurs dRA, $\Delta tRA$ et DRA sur la AR	105
2.4.7.2.1.3 L'importance du modèle cellulaire pour la RA	106
2.4.7.2.2 L'hormésis	107
2.4.7.2.2.1 L'hormésis dans les cellules humaines	107
2.4.7.2.2.2 Trois conclusions sur l'hormésis	108
2.4.7.2.2.3 L'hormésis et les données animales	108
2.4.7.2.3 L'hormésis : expériences in vitro et ex vivo	110
2.4.7.2.4 Hormésis chez l'homme : données épidémiologiques et cliniques	111

2.4.7.2.5 L'hormésis chez l'homme : quelques caractéristiques quantitatives	112
2.4.7.3 L'hypersensibilité aux faibles doses	113
2.4.8 Caractérisation radiobiologique de l'exposition scanographique	117
2.4.8.1 Étude des CDB après exposition scanographique	117
2.4.8.2 Étude des chromosomes	117
2.4.8.3 Étude des micronoyaux	118
2.4.8.4 Influence du modèle cellulaire	118
2.4.8.5 Influence de la dose et du protocole d'irradiation	118
2.4.8.6 Influence de l'énergie	119
2.4.8.7 Impact de la radiosensibilité individuelle	119
2.4.8.8 Influence du produit de contraste	120
2.4.8.8.1 Un peu d'histoire	120
2.4.8.8.2 Quand l'iode rencontre le tungstène	121
2.4.8.8.3 Les bons et les mauvais côtés d'une coïncidence	123
2.4.8.8.4 Influence de la radiosensibilité individuelle	125
2.5 Apport de la technologie Fibermetrix	126
<b>3 But de la thèse</b>	130
<b>4 Matériels et méthodes</b>	135
4.1 Lignées cellulaires	135
4.2 Culture cellulaire	137
4.2.1 Fibroblastes	137
4.2.2 Astrocytes	137
4.2.3 Cellules épithéliales mammaires	137
4.3 Immunofluorescence	139
4.4 Comptage des foci	139
4.5 Traitement des données et statistiques	140
4.6 Expositions cellulaires scanographiques	140
4.6.1 Protocoles scanner	140
4.6.2 Modèles d'exposition scanographique	141
<b>5 Résultats</b>	144
5.1 Vers un modèle unifié pour expliquer les phénomènes spécifiques des faibles doses ?	144
5.1.1 L'hypersensibilité aux faibles doses	144
5.1.2 La réponse adaptative	145
5.1.3 L'hormésis	146
5.1.4 Les contributions de l'HFD et de l'hormésis dans le débat sur les effets à faible dose et à faible débit de dose	148
5.1.5 Conclusions	155
5.2 Résultats scanographiques expérimentaux	157

5.2.1 Influence de la radiosensibilité individuelle en radiodiagnostic : Réponse biologique aux expositions scanographiques cérébrales	157
5.2.1.1 Doses délivrées en scanographie cérébrale	157
5.2.1.2 Effets radiobiologiques des expositions scanographiques cérébrales d'une et deux hélices	160
5.2.1.2.1 Effets radiobiologiques de ces expositions sur les fibroblastes humains	160
5.2.1.2.2 Effets radiobiologiques de ces expositions sur les astrocytes humains	162
5.2.1.3 Discussion	164
5.2.1.3.1 Discussion doses délivrées en scanographie cérébrale	164
5.2.1.3.1.1 Recueil des données	164
5.2.1.3.1.2 Discussion sur les PDL	164
5.2.1.3.1.3 Discussion sur les CTDIvol et la dose absorbée	166
5.2.1.3.2 Discussion sur les effets radiobiologiques des expositions scanographiques cérébrales	166
5.2.1.3.3 Figures expositions scanographiques cérébrales	170
5.2.2 Influence de la radiosensibilité individuelle en radiodiagnostic : Réponse biologique aux expositions scanographiques thoraciques	176
5.2.2.1 Doses délivrées en scanographie thoracique	176
5.2.2.2. Résultats radiobiologiques	179
5.2.2.2.1 Effets radiobiologiques d'un scanner thoracique sur les fibroblastes humains primaires	179
5.2.2.2.2 Effet radiobiologique du topogramme sur les fibroblastes humains primaires	180
5.2.2.2.3 Effets radiobiologiques du scanner thoracique sur les cellules épithéliales mammaires humaines primaire	181
5.2.2.3 Discussion	182
5.2.2.3.1 Discussion sur les doses délivrées en scanographie thoracique	182
5.2.2.3.1.1 Recueil des données	182
5.2.2.3.1.2 Discussion sur les indicateurs dosimétriques	182
5.2.2.3.2 Discussion sur les effets radiobiologiques des expositions scanographiques thoraciques	184
5.2.2.3.2.1 Cassures double-brin spontanées	184
5.2.2.3.2.2 Cassures double-brin radioinduites	185
5.2.2.3.2.3 Effet du topogramme	185
5.2.2.3.2.4 Les cellules hautement endommagées (CHE)	186
5.2.2.3.2.5 Conclusion	186
5.2.2.3.2.6 Figures expositions scanographiques thoraciques	188



<b>6 Discussion générale</b>	196
6.1 Les phénomènes radiobiologiques spécifiques des faibles doses	196
6.1.1 Généralités	196
6.1.2 Hypersensibilité aux faibles doses et expositions scanographiques	196
6.1.3 Hormésis, réponse adaptative et expositions scanographiques	198
6.1.4 Effets bénéfiques ou délétères ?	200
6.1.5 Vers un modèle unifié ?	203
6.2 Apport des données radiobiologiques sur les scanners	206
6.2.1 Un premier message : importance du facteur individuel	206
6.2.2 Deux études radiobiologiques très innovantes dans leur approche	207
6.3 Effet du produit de contraste	208
6.4 Quelles sont les conséquences radiobiologiques d'un examen scanographique d'après nos données ?	209
6.5 Apports du dispositif IVIsScan	211
6.5.1 Apports dosimétriques	211
6.5.2 Contrôle local des pratiques	211
6.2.1 Un premier message : importance du facteur individuel	206
<b>7 Conclusions et perspectives</b>	215
7.1 Conclusions personnelles sur ce travail de thèse	215
7.2 Perspectives	216
<b>8 Bibliographie</b>	217
<b>9 Articles</b>	241

## Liste des principales abréviations

<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>ALARA</b>	As Low As Reasonably Achievable
<b>ASN</b>	Autorité de Sûreté Nucléaire
<b>ATM</b>	Ataxia Telangiectasia Mutated
<b>ATR</b>	Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein
<b>BEIR</b>	Biological Effects of Ionizing Radiation
<b>BRCA1 et 2</b>	BRest CAncer protein 1 et 2
<b>CDB</b>	Cassure Double-Brin
<b>CEM</b>	Cellules Epithéliales Mammaires
<b>CHE</b>	Cellules hautement endomagées
<b>CIPR</b>	Comission Internationale de Protection Radiologique
<b>COMARE</b>	Committee on Medical Aspects of Radiation in the Environment
<b>COPERNIC</b>	COllection Pour la rEcherche sur la Radiosensibilité au Nlveau Clinique
<b>CSB</b>	Cassure simple-brin
<b>CTDI</b>	Computed Tomography Dose Index
<b>DB</b>	Dommages de Base
<b>EBR</b>	Efficacité Biologique Relative
<b>EURATOM</b>	Communauté européenne de l'énergie atomique
<b>Gy</b>	Gray
<b>H2AX</b>	Variant de l'histone H2A pouvant être phosphorylé par sa sérine 139 ( $\gamma$ H2AX)
<b>HFD</b>	Hypersensibilité aux Faibles Doses
<b>IRM</b>	Imagerie par Résonance Magnétique
<b>IRSN</b>	Institut de Radioprotection et de sûreté Nucléaire
<b>IVIsan</b>	Dispositif de dosimétrie et de monitoring de la dose développé par la société Fibermetrix
<b>IVIyou</b>	Interface informatique du dispositif IVIsan
<b>LNT</b>	Modèle linéaire sans seuil / Linear No-Threshold model
<b>LSS</b>	Life Spam Study
<b>NHEJ</b>	<i>Non-Homologous End-Joining. Mode de réparation cellulaire des CDB par suture</i>
<b>NLT</b>	Modèle non linéaire à seuil / No-Linear with Threshold model
<b>NRD</b>	Niveaux de Références Diagnostiques
<b>PCI</b>	Produit de Contraste Iodé
<b>PDL</b>	Produit Dose Longueur
<b>PMMA</b>	polymethylmethacrylate (polymère thermoplastique utilisé pour les fantômes dosimétriques)
<b>RA</b>	Réponse Adaptative
<b>SFR</b>	Société Française de Radiologie
<b>Sv</b>	Sievert (unité de mesure de la dose équivalente et de la dose efficace)
<b>UNSCEAR</b>	United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation
<b>UV</b>	Ultra-Violet
<b>VGD</b>	Valeurs Guides Diagnostiques

## Liste des figures

<b>Figure 1</b>	Premières images de scanographie	6
<b>Figure 2</b>	Schéma représentatif des premières générations de scanner	7
<b>Figure 3</b>	Schéma représentatif des technologies de scanner double-énergie	10
<b>Figure 4</b>	Historique des évolutions en scanographie	12
<b>Figure 5</b>	Schéma descriptif des grandeurs dosimétriques en scanographie	15
<b>Figure 6</b>	Schéma descriptif du phénomène d'overranging	15
<b>Figure 7</b>	Schéma explicatif du calcul de la dose efficace	18
<b>Figure 8</b>	Schéma des différents modèles de risque en faibles doses	32
<b>Figure 9</b>	Importance relative des effets d'interaction rayonnement-matière	45
<b>Figure 10</b>	Différentes étapes de la radiolyse de l'eau	49
<b>Figure 11</b>	Différents degrés de compactation de l'ADN	51
<b>Figure 12</b>	Différents types de dommages de l'ADN radioinduits	53
<b>Figure 13</b>	Exemples d'images d'immunofluorescence	56
<b>Figure 14</b>	Hiérarchie des évènements après un stress génotoxique	58
<b>Figure 15</b>	Représentation du "modèle de la chaussette"	61
<b>Figure 16</b>	Principales voies de réparation des CDB	63
<b>Figure 17</b>	Exemples d'images d'immunofluorescence pATM sur fibroblastes	66
<b>Figure 18</b>	Représentation schématisée de la survie cellulaire	68
<b>Figure 19</b>	Contribution des différentes morts cellulaires après irradiation	71
<b>Figure 20</b>	Notes manuscrites de Claudius Regaud	76
<b>Figure 21</b>	En-tête de communication de Léon Bouchacourt sur la radiosensibilité	78
<b>Figure 22</b>	Répartition de la radiosensibilité individuelle au sein de la population	80
<b>Figure 23</b>	Figure comparative entre radiosensibilité et fréquence du syndrome	91
<b>Figure 24</b>	Modèle ATM/MRE11/ $\gamma$ H2AX	94
<b>Figure 25</b>	Représentation schématisée du modèle du transit d'ATM	96
<b>Figure 26</b>	Comparaison des taux de CDB en faibles doses	98
<b>Figure 27</b>	Différence entre hormésis et RA	101
<b>Figure 28</b>	Schéma représentant l'effet d'hormésis en fonction de la dRA	102
<b>Figure 29</b>	Représentation graphique de l'HFD	114
<b>Figure 30</b>	Illustration schématisée de l'HFD en fonction du paramètre biologique	115
<b>Figure 31</b>	Spectre d'émission et d'absorption des rayons X liés au PCI	123
<b>Figure 32</b>	Photos du dispositif IVIscan de la société Fibermetrix	127
<b>Figure 33</b>	Cartographie de la dose en scanographie visionnée sur IVIyou	129
<b>Figure 34</b>	Récapitulatif des articles publiés	132
<b>Figure 35</b>	Culture cellulaire de cellules épithéliales mammaires	138
<b>Figure 36</b>	Exemple de comptage de foci $\gamma$ H2AX et pATM	140
<b>Figure 37</b>	Photos des fantômes utilisés pour les expositions cellulaires	142
<b>Figure 38</b>	Figure récapitulative du schéma expérimental	143
<b>Figure 39</b>	Illustration de l'HFD et de l'hormésis en fonction de la dose	149
<b>Figure 40</b>	Courbes dose-effet dans le cadre de l'hormésis et de l'HFD	151

<b>Figure 41</b>	Effet biologique de l'IR sur une population de différentes sensibilités	154
<b>Figure 42</b>	Modèle de transit d'ATM appliqué à la RA. L'HFD et l'hormésis	156
<b>Figure 43</b>	Cinétique $\gamma$ H2AX fibroblastes scanner cérébral	170
<b>Figure 44</b>	Cinétique excès $\gamma$ H2AX fibroblastes scanner cérébral	171
<b>Figure 45</b>	Cinétique pATM fibroblastes scanner cérébral	171
<b>Figure 46</b>	Cinétique excès pATM fibroblastes scanner cérébral	172
<b>Figure 47</b>	Cinétique $\gamma$ H2AX astrocytes scanner cérébral	173
<b>Figure 48</b>	Cinétique excès $\gamma$ H2AX astrocytes scanner cérébral	174
<b>Figure 49</b>	Cinétique pATM astrocytes scanner cérébral	174
<b>Figure 50</b>	Cinétique excès pATM astrocytes scanner cérébral	175
<b>Figure 51</b>	Cinétique $\gamma$ H2AX fibroblastes scanner thoracique	188
<b>Figure 52</b>	Cinétique pATM fibroblastes scanner thoracique	189
<b>Figure 53</b>	Cinétique d'excès $\gamma$ H2AX fibroblastes scanner thoracique	190
<b>Figure 54</b>	Cinétique $\gamma$ H2AX fibroblastes scanner thoracique et topogramme	191
<b>Figure 55</b>	Cinétique pATM fibroblastes scanner thoracique et topogramme	192
<b>Figure 56</b>	Cinétique d'excès $\gamma$ H2AX et pATM fibroblastes avec topogramme	193
<b>Figure 57</b>	Cinétique $\gamma$ H2AX fibroblastes et CEM scanner thoracique	194
<b>Figure 58</b>	Cinétique des pourcentages de CHE en scanner thoracique	195
<b>Figure 59</b>	Jauge colorimétrique IVIyou	212
<b>Figure 60</b>	Exemple 1 de cas détectable par le dispositif IVIscan	213
<b>Figure 61</b>	Exemple 2 de cas détectable par le dispositif IVIscan	214

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b>	Doses moyennes aux organes pour un acte scanographique	17
<b>Tableau 2</b>	Facteurs de pondération tissulaire Wt	18
<b>Tableau 3</b>	Facteurs de conversion globaux Dose efficace à partir des PDL	19
<b>Tableau 4</b>	Doses efficaces moyennes associées aux examens de scanographie	20
<b>Tableau 5</b>	Tableau comparatif des doses efficaces délivrées en radiodiagnostic	21
<b>Tableau 6</b>	NRD et VGD en scanographie chez l'adulte	29
<b>Tableau 7</b>	NRD en scanographie pédiatrique	29
<b>Tableau 8</b>	Principaux syndromes génétiques associés à une radiosensibilité	90
<b>Tableau 9</b>	Tableau récapitulatif des lignées cellulaires utilisées dans ce travail	135
<b>Tableau 10</b>	Paramètres dosimétriques des protocoles expérimentaux	141
<b>Tableau 11</b>	Tableau comparatif des paramètres dosimétriques en scanner cérébral	159
<b>Tableau 12</b>	Tableau comparatif des paramètres dosimétriques en scanner thorax	178

## 1 Introduction

L'étude des effets des faibles doses de radiations ionisantes est un enjeu de santé publique majeur toujours largement débattu au sein de la communauté scientifique et médicale<sup>1</sup>. Les expositions provenant de sources naturelles de radiations constituent la composante la plus importante de l'exposition humaine. Toutefois, cette dernière reste relativement stable et limitée à l'échelle historique, contrairement à celle due aux sources artificielles et plus particulièrement celle liée aux expositions médicales qui n'a cessé d'augmenter depuis le début du XXème siècle. En particulier, de 1980 à 2006, la dose efficace annuelle moyenne par habitant due aux expositions médicales est passée de 0.51 à 3 mSv aux États-Unis <sup>2</sup>. La part relative de l'exposition médicale représente aujourd'hui 48% de l'exposition totale pour la population américaine et 35% pour la population française <sup>3</sup>.

Les examens par scanner représentent la contribution la plus importante à l'exposition médicale aux radiations ionisantes. Depuis leur introduction dans les années 70<sup>4</sup>, le nombre de scanners et d'actes radiodiagnostiques a explosé dans les pays développés<sup>5</sup>. Même si le radiodiagnostic impliquant des scanners ne représente qu'une faible partie du nombre d'actes médicaux réalisés en France (10,4%), il contribue aujourd'hui à la majeure partie de la dose délivrée en radiodiagnostic (71,3% contre 58% en 2007) <sup>6</sup> et participe à lui seul à 24% de la dose d'exposition totale de la population en France en 2012 (1,6mSv/an).

Alors que le scanner constitue un outil de diagnostic non invasif, rapide et extrêmement précis pour les médecins et malgré son impact indéniable sur l'amélioration des soins de santé, l'exposition liée aux examens scanographiques ionisants présente un risque non négligeable et les chercheurs se sont surtout focalisés sur les risques potentiels de cancers radioinduits, notamment les leucémies et les tumeurs du cerveau<sup>7-21</sup>. Ces études ont été réalisées majoritairement chez l'enfant <sup>22</sup>. Cependant, l'évaluation du risque a été limitée par de nombreux biais méthodologiques liés à la prise en compte ou non de certains examens, à l'évaluation rétrospective des doses reçues et/ou à un manque de puissance statistique<sup>23-25</sup>.

L'effet de la radiosusceptibilité inter-individuelle et inter-tissulaire n'a pas été évaluée dans les examens scanographiques. Face à l'émergence du concept de médecine personnalisée, ces facteurs devraient être pourtant activement pris en compte afin de

mieux évaluer le risque de cancer<sup>26-28</sup>. La problématique du risque lié aux irradiations en scannographie peut concerner en effet des patients génétiquement prédisposés au cancer et/ou dont les gènes de prédisposition sont impliqués dans les mécanismes de signalisation et de réparation des lésions radioinduites, comme par exemple les gènes ATM, p53, BRCA1 ou BRCA2<sup>29</sup>.

De nombreuses institutions, notamment l'Académie des sciences des USA, ont identifié par le rapport du comité BEIR VII (Biologic Effects of Ionizing Radiation) les besoins de recherche en faibles doses en citant divers marqueurs moléculaires spécifiques des dommages de l'ADN, l'évaluation de la capacité et de la fidélité de réparation des dommages radioinduits, en particulier des cassures double-brin de l'ADN, l'étude des effets des phénomènes spécifiques des faibles doses que sont la réponse adaptative, l'hypersensibilité aux faibles doses, l'hormésis et les facteurs génétiques qui influencent la réponse aux radiations et le risque de cancer<sup>30</sup>. Notre Unité de Recherche s'est spécialisée dans l'évaluation de la réponse individuelle dans des conditions réalistes d'exposition aux radiations et a développé un modèle mécanistique, le modèle du transit d'ATM, qui permet aujourd'hui de mieux comprendre la réponse individuelle aux radiations.

Au besoin de mieux connaître l'influence de la réponse individuelle dans l'exposition scanographique s'ajoute également la nécessité d'un meilleur contrôle dosimétrique dans des conditions d'examens spécifiques<sup>31</sup>. En effet, les doses délivrées peuvent varier en fonction de la morphologie du patient, de la région corporelle explorée et également du scanner utilisé<sup>32</sup>. Grâce à l'apport de la société Fibermetrix, partenaire de cette thèse Cifre, et développeur d'une technique de dosimétrie très novatrice basée sur la fibre optique, nous avons pu documenter les pratiques cliniques utilisées dans plusieurs services de radiologie et également mesurer avec précision la dose de radiation reçue par les cellules dans chaque condition d'examen scanographique.

Ainsi, bénéficiant d'un savoir-faire dans la détermination de la dose *physique* et de la dose *biologique*, nous avons entrepris de mieux prédire les risques potentiels liés aux examens par scanner.

## **2 Rappels bibliographiques**

Comme on l'a dit dans l'introduction, l'imagerie par scanner est l'un des examens radiologiques les plus irradiants. Du point de vue radiobiologique, afin de mieux comprendre les risques liés à une seule séance d'imagerie par scanner ou à la succession de plusieurs, nous devons mieux définir ce qu'est un scanner, ce qu'il représente en termes de dose absorbée, quelles sont les mesures prises pour en justifier voire en limiter l'usage, quel est l'état des connaissances sur l'épidémiologie liée au scanner et enfin, quelles questions radiobiologiques spécifiques il peut poser. La littérature scientifique et médicale sur le sujet est surabondante et nos rappels bibliographiques n'ont pas la vocation d'être exhaustifs mais au contraire de faire la synthèse critique et sélective de certains points particuliers qui nous ont guidés dans notre démarche et notre méthodologie.

### **2.1 Principes généraux et technologie du scanner**

#### **2.1.1 Historique et définition**

##### **2.1.1.1 Les débuts de la scanographie clinique**

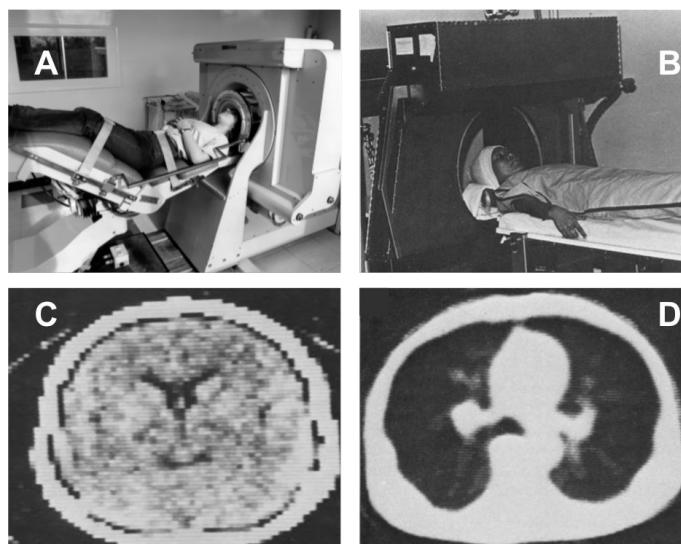
Le 28 décembre 1895, Wilhelm Roentgen publie son manuscrit sur la découverte des rayons X<sup>33</sup>. Il a notamment imagé les os de la main de sa femme avec son alliance. Cette radiographie est la première d'une longue série de clichés pris au cours des 120 années suivantes. Cette découverte a mis en évidence une nouvelle façon de voir le corps humain et a été le point de départ d'un développement considérable en imagerie médicale.

Dans les années 1960, le Dr Allan Cormack, physicien des particules, et le Dr William Oldendorf, neurologue, ont montré de manière indépendante que de multiples mesures d'atténuation radiographique autour d'une cible permettaient de calculer une image de cette cible. Malheureusement, le manque de puissance des ordinateurs de cette époque a limité l'application de ce concept<sup>34</sup>. Sans connaissance de ces travaux antérieurs, au début de l'année 1967, la maison de disque EMI (Electrical Musical Industries), donne le feu vert à Godfrey N. Hounsfield, ingénieur électricien et informatique, pour commencer ses travaux sur ce qui deviendra le scanner. EMI est à la base une maison de disque née de la fusion de Columbia Records et de la Gramophone Company en 1931. L'industrie de la musique enregistrée connaît une croissance incroyable dans les années 1950. En



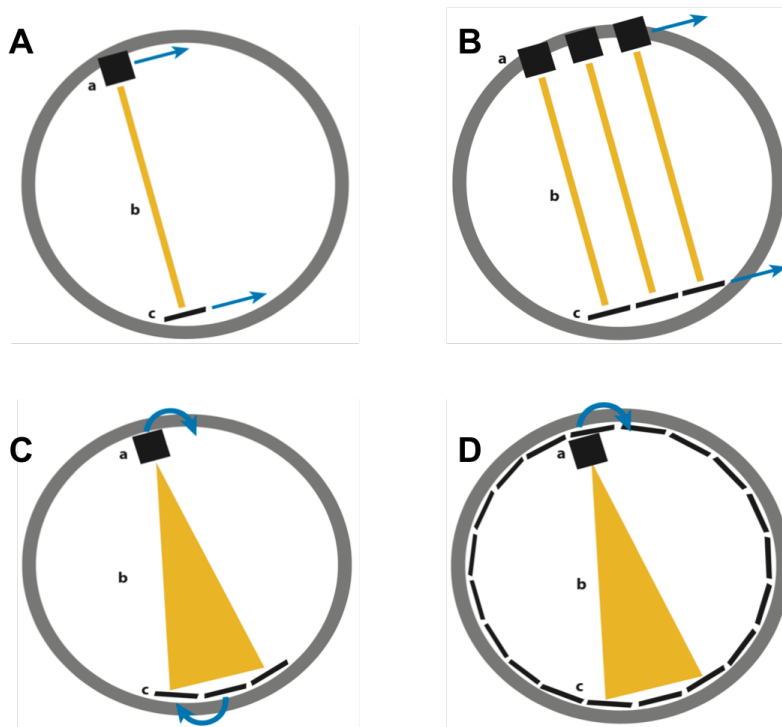
1962, un riche homme d'affaires de Liverpool, Brian Epstein, décide de prendre en charge un groupe local populaire, les Beatles. Il les emmène chez l'une des plus grandes maisons de disques britanniques, Decca, mais le label décide de ne pas produire le groupe, en partie parce que ses dirigeants pensent que la musique à base de guitare est "en voie de disparition". Imperturbable, Epstein emmène le groupe chez le principal concurrent de Decca au Royaume-Uni, EMI. C'est là qu'un jeune et talentueux producteur de musique, George Martin, voit l'immense potentiel du groupe, et EMI décide donc de produire les Beatles. Quatre mois plus tard, les Beatles sortent leur premier single au Royaume-Uni, « Love Me Do ». Leur prochain single, "Please Please Please Me", sera numéro 1 des ventes. Au cours de la première année d'exploitation des Beatles au sein de l'entreprise, les bénéfices d'EMI augmentent de 80 %<sup>35</sup>. La maison de disques dispose ainsi des ressources financières suffisantes pour permettre à Godfrey Hounsfield de commencer ses travaux. Hounsfield pensait qu'il pouvait diriger des faisceaux de rayons X sous différents angles à travers un objet solide et ainsi créer une image en deux dimensions de l'intérieur de l'objet grâce à l'atténuation des faisceaux émergents. La première tomographie axiale par ordinateur est réalisée en 1967 en dirigeant les rayons X à travers l'objet analysé à des angles de 1°, avec deux détecteurs tournant en tandem. A cause de la faible intensité de la source d'américium utilisée, le balayage prendra 9 jours et la reconstitution de l'image 2.5 heures<sup>36</sup>. Ce n'est que quatre ans plus tard, en 1971, avec l'aide d'un radiologue appelé Jamie Ambrose, que l'histoire de la scanographie clinique commence réellement avec le premier cliché scanographique de la tête d'un patient vivant avec le scanner EMI « Mark I » à l'hôpital Atkinson Morley. Cet équipement utilisait une technologie de « step and shoot » pour une résolution spatiale de 0.5 cm avec une matrice de 80x80. Le patient est allongé sur un canapé réglable hydrauliquement et sa tête est insérée dans un capuchon en latex qui est placé dans une boîte en plastique contenant de l'eau<sup>37</sup>. En augmentant la quantité d'eau dans la boîte, le capuchon est pressé confortablement mais fermement sur la tête, pour minimiser l'interposition d'air<sup>37</sup>. La reconstruction s'effectua toute la nuit mais finit par produire une image reconnaissable d'une tumeur du cerveau. « My god ! it does work ! » s'exclama Hounsfield. Le premier modèle de production du scanner EMI prenait 4 minutes par tranche et 7 minutes par reconstruction. La première description de la tomographie axiale par ordinateur dans la littérature sera publiée en 1973<sup>4</sup>.

Même si Cormack et Hounsfield ne se sont jamais rencontrés, et n'avaient pas non plus de formation médicale ou même d'intérêt pour la médecine, ils reçurent tous les deux le prix Nobel de physiologie et de médecine en 1979 pour la tomographie axiale par ordinateur «la plus grande avancée en médecine radiologique depuis la découverte des rayons X ». Cormack a été cité pour ses analyses mathématiques et Hounsfield pour le développement pratique de la machine<sup>34</sup>. Les dirigeants d'EMI ont acquis la conviction que l'innovation de Hounsfield pouvait lui donner un avantage de premier plan dans le domaine de l'imagerie diagnostique. Peu après les essais réussis d'Atkinson Morley, EMI a dû prendre la décision de commercialiser le nouveau scanner. Bien que l'entreprise possédait une vaste expérience dans le domaine de l'électronique, il s'agissait avant tout d'une maison de disques et elle n'avait pratiquement aucune expérience dans le marché très concurrentiel de l'équipement médical. En 1971, pour la première année depuis une décennie sans sortie des Beatles, l'industrie de la musique représentait 56 % des ventes totales d'EMI. Même pour une entreprise de cette taille, l'entrée sur le territoire méconnu de l'équipement médical était aléatoire<sup>35</sup>. Les dirigeants d'EMI ont estimé qu'il leur fallait vendre 25 scanners dans le monde entier pour en faire un produit commercialement viable<sup>34</sup>. Heureusement, les mérites intrinsèques de l'innovation de Hounsfield ont été plus que suffisants pour propulser le produit vers le succès<sup>35</sup>. En juin 1974, EMI avait déjà vendu 35 scanners rien qu'aux Etats Unis. Cependant, ils n'avaient pas prévu la rapidité à laquelle la technologie pourrait être reproduite et améliorée et en 1974 son monopole s'arrêta. Deux autres appareils firent leur apparition sur le marché : le scanner ACTA, développé à l'Université de Georgetown et le Delta Scanner de l'Ohio Nuclear. En plus d'être moins cher, ces scanners de deuxième génération permirent l'exploration de la tête mais également du corps et réduisirent considérablement le temps de balayage avec une meilleure résolution sans sac d'eau pour maintenir le patient<sup>34</sup>. Les premières images de scanner thoracique sont publiées en février 1975, à l'aide du scanner ACTA<sup>38</sup>. Les temps de balayage sont inférieurs à une minute et la matrice de 80x80 du premier scanner EMI est remplacé par une matrice de 320x320.



**Figure 1** : **A** : Scanner EMI Mack I 1971 (source London museum of science)  
**B** : Scanner ACTA 1974 <sup>38</sup> **C** : Première image de scanner cérébrale <sup>37</sup>  
**D** : Première image de scanner thoracique<sup>38</sup>

En 1976, les capacités de production d'EMI ne suffisent plus face à la montée en flèche de la demande et cela incite fortement de nouveaux concurrents à rentrer sur le marché, notamment General Electric (GE), Siemens et Philips<sup>35</sup>. GE sortira un scanner de troisième génération en 1976, utilisant une nouvelle technologie de faisceau en éventail réduisant de nouveau le temps de balayage. En quelques années Siemens et GE deviennent les leaders mondiaux des scanners de troisième génération. En 1989, l'imagerie change drastiquement avec l'apparition des scanners à acquisitions hélicoïdales (ou spirales) produits par Siemens. Le tube tourne continuellement autour du patient en mouvement dans le portique<sup>34</sup>.



**Figure 2 :** Schéma représentatif des quatre premières générations de scanner. **A :** Première génération (EMI scanner 1971). Le schéma montre (a) une source unique de rayons X qui produit (b) un faisceau de rayons incident sur (c) un seul détecteur. La source et le détecteur se déplacent à un certain angle en fonction du patient. Le processus est répété à des intervalles de  $1^\circ$  pour un total de  $180^\circ$ . **B :** Deuxième génération (type ACTA 1974). Le schéma montre (a) une rangée de sources de rayons X qui produisent (b) des faisceaux de rayons incidents sur (c) plusieurs détecteurs. Comme pour la première génération, la source et le détecteur se déplacent ensemble à un certain angle par rapport au patient. Le processus est répété à intervalles de  $1^\circ$  pour un total de  $180^\circ$ . **C :** Troisième génération (GE 1976). Le schéma montre (a) une source unique de rayons X qui produit (b) un faisceau incident en éventail sur (c) plusieurs détecteurs. La source et les détecteurs tournent autour du patient. **D :** Quatrième génération (Siemens 1989). Le schéma montre (a) une seule source de rayons X qui produit (b) un faisceau incident en éventail sur (c) un réseau circulaire de détecteurs fixes<sup>39</sup>.

### **2.1.1.2 La guerre des coupes**

Le mode hélicoïdal, qui permet de scanner l'ensemble de la poitrine ou de l'abdomen en une seule inspiration a été une révolution qui a de nouveau réduit les temps de balayage grâce notamment à des rotations de tube plus rapides et donné lieu à de nombreux développements cliniques. La révolution suivante arrivera en 1998 avec l'introduction des scanners avec quatre détecteurs qui multiplie le nombre et la taille des coupes grâce à des détecteurs plus petits montés en rangées (barrettes). L'acquisition simultanée de quatre hélices entrelacées augmente le volume et la résolution spatiale de l'imagerie en un seul balayage. Ceci aura pour effet d'améliorer notamment les applications en angiographie et en cardiologie avec l'injection de produits de contraste<sup>40</sup>. En 2002, on passera à 16 détecteurs, puis 64 en 2004. Bien que cette dernière technologie soit adéquate pour de nombreuses applications cliniques, elle est insuffisante pour rivaliser avec le détail anatomique et la visualisation en temps réel fournis par l'angiographie classique par cathéter. Ainsi en 2010, dans l'espoir d'atteindre la résolution spatiale offerte par les tubes de fluoroscopie en évitant les procédures invasives par cathéter, des scanners de 320 détecteurs sont mis au point<sup>39</sup>. Ils offrent une meilleure sensibilité, une meilleure imagerie au niveau artériel ainsi qu'une diminution des artéfacts et du temps de balayage. Ces nouveaux appareils offrent également des perspectives intéressantes en oncologie avec une imagerie quantitative de la taille des tumeurs et donc un suivi de réponse aux traitements anti-tumoraux. La haute résolution temporelle et la couverture d'une zone étendue offertes par ces scanners multi détecteurs peuvent également fournir des informations fonctionnelles en imageant le cœur dans plusieurs phases du cycle cardiaque<sup>39</sup>.

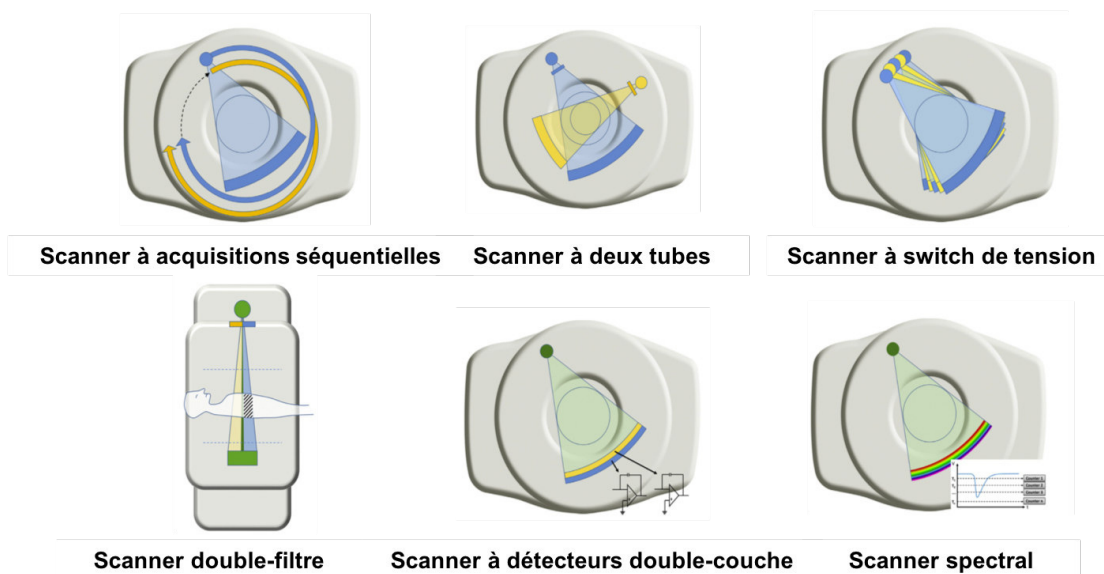
### **2.1.1.3 Scanographie double énergie**

Une des autres évolutions technologiques en scanographie est l'apparition des scanners double-énergie. Étant donné que le coefficient d'atténuation de masse varie en fonction de l'énergie des rayons X, cette technologie permet de distinguer différents matériaux par l'acquisition de deux séries d'images à deux énergies différentes (avec et sans produit de contraste par exemple). Il existe six technologies de scanner double-énergie différentes<sup>39,41</sup> :

- **Scanner à acquisitions séquentielles** : Dans ces scanners, deux acquisitions indépendantes sont réalisées, à basse et haute énergie (80 et 140 kVp). Le protocole de chacune des deux hélices peut être optimisé individuellement à l'aide de filtres et d'une modulation de courant du tube. Il n'y a pas non plus de dispersion croisée entre les deux projections. Étant donné que c'est une technologie conventionnelle basée sur une seule source et un seul détecteur, ces scanners sont relativement rentables. En revanche, le laps de temps entre les deux hélices et les mouvements potentiels du patient peuvent engendrer un mauvais enregistrement temporel entre les balayages et constitue donc le principal inconvénient de cette technique.
- **Scanner à deux tubes** : Ces scanners utilisent deux tubes et deux systèmes de détections installés à 90° l'un par rapport à l'autre. Cependant la taille des détecteurs varie et le champ d'irradiation est différent. Ceci peut être limitant pour les images de grande dimension. On peut alimenter ces tubes à deux tensions différentes pour créer deux énergies différentes mais également à une même tension pour avoir une acquisition rapide avec une résolution temporelle accrue pour un scanner cardiaque. L'utilisation de deux tubes peut en revanche augmenter la dose déposée. De plus l'utilisation simultanée des deux tubes peut engendrer une contamination entre les deux acquisitions.
- **Scanner à switch de tension** : Ces scanners utilisent un tube à rayons X qui est capable de commuter rapidement entre basses et hautes énergies grâce à un switch de tension appliqué en quelques microsecondes. Cela permet d'effectuer deux acquisitions simultanément avec une excellente résolution temporelle. De plus, l'information des deux énergies est disponible sur l'ensemble du champ d'irradiation. En revanche, la dose ne peut être optimisée individuellement étant donné que la tension du tube est alternativement modifiée entre les deux réglages. La dose de rayonnement peut donc être légèrement plus élevée.
- **Scanner double-filtre** : Cette technologie utilise une seule source mais deux filtres de natures différentes en or (basses énergies) et en étain (hautes énergies) qui vont cliver le faisceau. Cette méthode permet d'avoir une acquisition double-énergie sur l'intégralité du champ d'irradiation et une dose plus faible étant donné que la partie des basses énergies est plus faible. La partie centrale du faisceau a

cependant une énergie mixée et les parties corporelles irradiées ne le sont pas simultanément.

- **Scanner à détecteurs double-couche** : Ces scanners discriminent les photons en fonction de leur énergie au niveau des détecteurs et non du tube, grâce à la différence de sensibilité des matériaux qui les composent. La première couche du détecteur sera plus sensible aux basses énergies (ZnSe ou CsI), la seconde aux hautes ( $Gd_2O_2S$ ).
- **Scanner spectral** : Alors que les scanners à détecteurs double-couche intègrent l'énergie déposée dans deux bandes spectrales distinctes, les détecteurs de comptage de photons séparent ces derniers à l'aide de bacs en fonction de leur énergie. Il est possible d'utiliser deux à huit bacs différents permettant autant de décompositions spectrales. Cependant, de multiples défis persistent dans la construction d'un prototype stable. Ces défis comprennent l'empilement des photons, le partage des charges entre les éléments détecteurs, la polarisation du détecteur après un fonctionnement prolongé et l'incapacité de gérer adéquatement le flux de photons à pic élevé typique de la tomodensitométrie. Pour ces raisons, ces scanners sont encore en cours de développement et les versions commerciales ne sont pas disponibles.



**Figure 3** : Schéma représentatif des différentes technologies de scanners double-énergie décrites ci-dessus<sup>41</sup>

L'amélioration des technologies développées ainsi que l'élargissement du champ d'applications cliniques rendues possibles par la scanographie hélicoïdale multi-détecteurs rapides ont entraîné une utilisation accrue de cette modalité et soulevé des questions concernant la dose de rayonnement aux patients. En effet, la scanographie multi-détecteurs confère un profil de dose plus élevé que le scanner à détecteur unique, jusqu'à 27 % plus élevé dans le plan et 69 % plus élevé dans le plan adjacent de la zone balayée<sup>42</sup>. Diverses stratégies de réduction de la dose de rayonnement, telles que l'augmentation du pas et l'abaissement du courant du tube, ont été mises en œuvre<sup>43</sup>. De plus, les systèmes de modulation automatique du courant dans les tubes ont optimisé la qualité de l'image et réduit l'exposition au rayonnement sans sélection arbitraire du courant dans les tubes par les opérateurs<sup>44,45</sup>. Des innovations plus récentes dans la technologie des tomodensitomètres ont également permis d'améliorer la qualité de l'image, de généraliser les applications et de réduire les doses de rayonnement<sup>39</sup>.

#### **2.1.1.4 Reconstruction itérative**

La reconstruction des images est un élément essentiel en scanographie. Elle peut être vue comme la résolution d'un système d'équations et d'inconnues composé des valeurs d'atténuation des rayons X des parties de l'objet ou du patient traversé. Trois facteurs vont rendre la reconstruction des coupes scanner difficile :

- Les limitations de la puissance de calcul disponible.
- La complexité des acquisitions par scanner de par leur géométrie (acquisitions hélicoïdales, multicoupes etc...) et biophysique (caractère polychromatique du faisceau, interaction du faisceau avec la matière, rayonnement diffusé etc...).
- La perturbation liée au bruit.

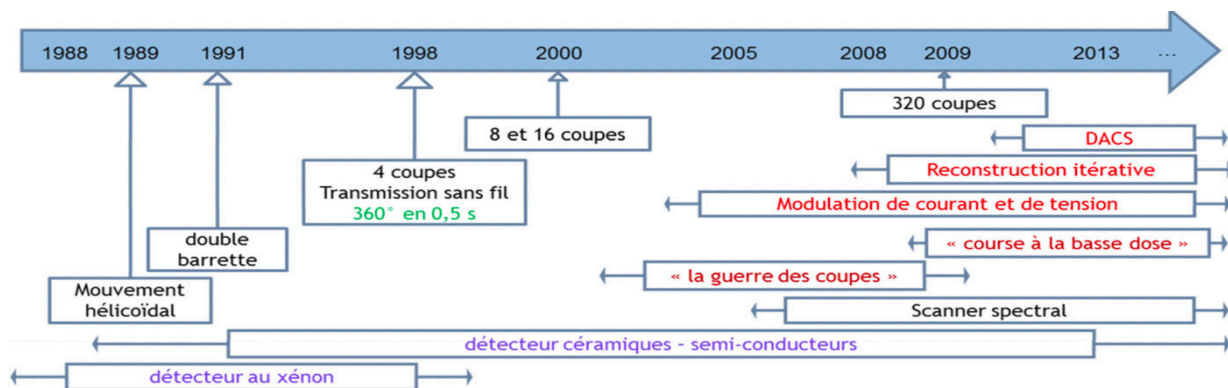
Cette dernière difficulté et la volonté de réduire l'exposition des acquisitions en scanner poussent les constructeurs à s'intéresser à des méthodes de reconstruction plus sophistiquées. En effet, les performances de la rétroprojection filtrée s'avèrent très altérées par le manque de dose : une diminution de la dose est nécessairement responsable d'une augmentation du bruit sur les mesures, avec un bruit qui dégrade au final sérieusement la qualité des images reconstruites par rétroprojection filtrée. Ceci a tourné l'attention des constructeurs vers des méthodes alternatives, déjà utilisées en



médecine nucléaire ou étudiées depuis longtemps dans les laboratoires de recherche de mathématiques appliquées, et finalement rendues possibles pour le scanner grâce à l'augmentation des puissances de calcul disponibles<sup>46</sup>.

Les algorithmes de reconstruction itérative apparaissent en 2008 et constitue donc une avancée pour la réduction des doses (-23 à -76% de la dose<sup>46</sup>). Ils fonctionnent par approximations successives et permettent en effet de réduire le bruit dans les images et ainsi de diminuer les doses des examens. Dans un premier temps proposé en option chez quelques fabricants, ces algorithmes font dorénavant partie des caractéristiques de base des scanners quel que soit le fabricant, et sont utilisés en routine clinique. Les fabricants poursuivent les développements et améliorations en la matière et proposent aujourd'hui la 4<sup>ème</sup> génération de ces algorithmes<sup>47</sup>.

En revanche, la reconstruction itérative modifie les images de façon variable et il est difficile de prédire l'impact que cela va avoir sur les performances du radiologue. Cela peut en effet changer leurs habitudes d'interprétation. De plus, en cherchant à éliminer ce qu'il croit être du bruit, l'algorithme peut supprimer une information potentiellement pertinente de l'image<sup>46</sup>. Les paramètres de ces algorithmes sont de plus en plus nombreux et spécifiques de chaque constructeur qui les garde secrets. Cela complique l'optimisation des paramètres et freine les futures recherches et innovations collectives dans le domaine. Les mouvements du patient et les spécificités des acquisitions multiénergie décrites dans le paragraphe précédent, restent un challenge pour ces reconstructions<sup>46</sup>.



**Figure 4 :** Historique des évolutions technologiques en scanographie à partir des années 90<sup>47</sup>

## 2.2 Doses et principes de radioprotection liés au scanner

### 2.2.1 Rappels des bases réglementaires

Le scanner est un examen médical qui met en œuvre des rayonnements ionisants et nécessite donc la mise en place d'une radioprotection réglementée spécifique. Comme pour toutes les expositions au rayonnement ionisant, c'est la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) qui est à l'origine des recommandations sur les normes de radioprotection au niveau mondial. Ces recommandations sont ensuite prises en compte en droit européen dans les Directives Euratom, puis transposées dans la réglementation nationale des états membres dans leurs lois et leurs décrets. En France, l'Autorité de Sûreté Nucléaire donne son avis au Gouvernement sur les projets de lois, de décrets et d'arrêtés ministériels et prend des décisions réglementaires à caractère technique pour compléter les modalités d'application de ces derniers. Elle est également en charge de l'inspection des installations hospitalières où sont réalisés les examens irradiants. L'ASN produit également depuis 2011 des rapports spécifiques à la scanographie et des recommandations notamment sur les Niveaux de Référence Diagnostiques (NRD) <sup>48,49</sup>.

Les principales recommandations de la CIPR et la directive 2013/59, qu'elles concernent ou pas spécifiquement les scanners, sont basées sur la notion de dose de radiation et les principes de justification, d'optimisation et de limitation de la dose (Directive Euratom 2013/59).

- La **justification** : l'exposition au rayonnement doit produire suffisamment d'avantages pour les personnes exposées, ou pour la société, pour compenser les inconvénients potentiels du rayonnement.

- L'**optimisation** : mise en œuvre de procédures et de techniques visant à maintenir les expositions au niveau le plus bas possible. C'est le principe ALARA (« As low As reasonably Achievable »)

- La **limitation** des doses : maintenir les doses de rayonnement reçues dans les limites spécifiées. Ce principe est applicable aux travailleurs et au public, mais il

n'est pas applicable aux patients car il convient de réaliser des examens de qualité diagnostique et donc d'utiliser les doses de rayonnement nécessaires pour cela.

## 2.2.2 Généralités sur la dose et les indicateurs spécifiques pour le scanner

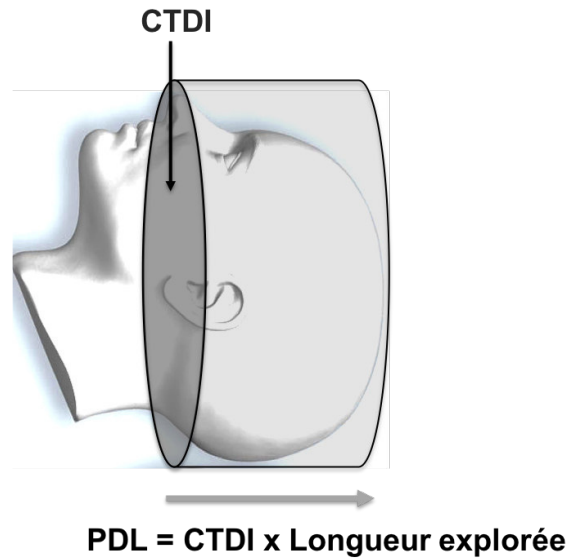
### 2.2.2.1 Dose absorbée et ses indicateurs spécifiques pour le scanner

La dose absorbée  $D$  est définie comme étant l'énergie totale  $E$  exprimée en Joules (J) déposée dans un milieu de masse  $M$  exprimée en kilogrammes (Kg). L'unité de dose absorbée est le Gray (Gy) qui correspond à des joules par kilogramme.

$$D \text{ (Gy)} = \frac{E \text{ (J)}}{M \text{ (Kg)}} \quad (1)$$

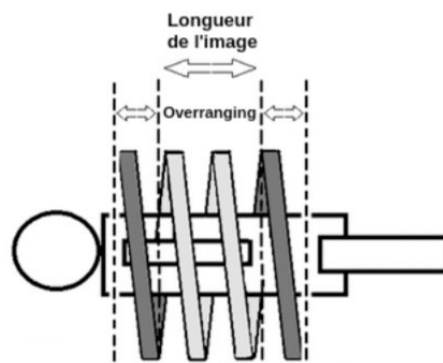
Le scanner délivre une irradiation différente par rapport à la radiographie. Elle est délivrée de manière circonférentielle. Deux indicateurs spécifiques de dose sont utilisés pour la caractériser :

- **Le CTDI (*Computed Tomography Dose index*) ou IDSV (*Indice de Dose de Scanographie Volume*)** : Exprimé en mGy, il représente la dose intégrale reçue pour une seule coupe de scanner.
- **Le PDL (*Produit Dose Longueur*)** : Exprimé en mGy.cm. Il permet de tenir compte de l'irradiation reçue pour une coupe (CTDI) multipliée par la longueur de champ explorée.



**Figure 5 :** Schéma descriptif des grandeurs dosimétriques en scanographie pour un examen crâne

Ces indicateurs présentent cependant certaines limites <sup>50-52</sup>. En effet lors d'un scanner hélicoïdal, l'irradiation commence avant la première image et finit après la dernière image afin d'éviter tout bruitage et assurer la qualité de cette dernière. Dans la mesure où la table se déplace de manière continue, l'irradiation doit commencer avant et se terminer après la zone imagée. Ce phénomène, appelé en anglais « overranging », peut modifier la dose réellement délivrée sans que cela soit pris en compte dans la dose donnée à la console par le logiciel du scanner.



**Figure 6 :** Schéma descriptif du phénomène d'overranging

Des évolutions technologiques, telles que le collimateur dynamique, permettent cependant de limiter cet effet <sup>51</sup>. Le CTDI est calculé à partir de fantômes et d'une chambre d'ionisation de 10 cm. Les deux fantômes utilisés sont des cylindres en plexiglas de 15 cm de longueur et 32 cm de diamètre (censé représenter un corps adulte) pour le premier, et de 16 cm (censé représenter soit une tête adulte, soit un corps d'enfant) pour le second. Le CTDI ne va donc pas prendre en compte la totalité du rayonnement diffusé étant donné que les zones d'exploration sont parfois plus longues que les 15 cm du fantôme et les 10 cm de la chambre d'ionisation<sup>53</sup>. De plus, les morphologies des patients exposés peuvent varier, particulièrement en pédiatrie, et donc induire une incertitude parfois élevée<sup>54,55</sup>. Un autre facteur à considérer dans le calcul du CTDI, est l'homogénéité de la dose dans le patient. La dose affichée est la dose moyenne dans un fantôme placé à l'isocentre du scanner et dont la composition et la densité sont parfaitement uniformes. Ceci n'est pas forcément représentatif de la réalité et peut, là encore faire varier significativement la dose à certains organes si le patient n'est pas centré<sup>56-58</sup>. D'autre part, le PDL est donné à partir d'un CTDI uniforme sur l'ensemble de la zone imagée alors que ce dernier peut varier au cours de l'exploration.

Acte scanographique complet (code CCAM)	PDL <sub>moy</sub> (mGy.cm)	CTDI <sub>vol,moy</sub> (mGy)	D <sub>moy</sub> aux organes par acte	
			Organe	Dose (mGy)
Crâne et son contenu, avec injection de produit de contraste (ACQH003) (n <sub>moy</sub> = 1,5 acq. / exam.)	1408	82	Cerveau	70
Cristallin			85	
Thyroïde <sup>(1)</sup>			10	
Seins <sup>(1)</sup>			< 0,1	
Utérus <sup>(1)</sup>			< 0,1	
Crâne et son contenu, sans injection de produit de contraste (ACQK001) (n <sub>moy</sub> = 1,03 acq. / exam.)	1013	59	Cerveau	50
Cristallin			60	
Thyroïde <sup>(1)</sup>			7	
Seins <sup>(1)</sup>			< 0,1	
Utérus <sup>(1)</sup>			< 0,1	
Thorax avec injection de produit de contraste (ZBQH001) (n <sub>moy</sub> = 1,06 acq. / exam.)	475	12,9	Seins	20
Organes situés dans la zone explorée			20	
Utérus			0,1	
Estomac <sup>(1)</sup>			8	
Seins			20	
Thorax sans injection de produit de contraste (ZBQK001) (n <sub>moy</sub> = 1,03 acq. / exam.)	415	11,9	Organes situés dans la zone explorée	20
Utérus			0,1	
Estomac <sup>(1)</sup>			7	
Seins			20	
Organes situés dans la zone explorée			20	
Abdomen et pelvis avec injection de produit de contraste (ZCQH001) (n <sub>moy</sub> = 1,8 acq. / exam.)	1146	27,6	Utérus	35
Ovaires			35	
Organes situés dans la zone explorée			35	
Seins			4	
Testicules <sup>(1)</sup>			15	
Abdomen et pelvis sans injection de produit de contraste (ZCQK004) (n <sub>moy</sub> = 1,14 acq. / exam.)	711	16,2	Seins	2
Utérus			20	
Ovaires			20	
Organes situés dans la zone explorée			20	
Testicules <sup>(1)</sup>			10	
Thorax, abdomen et pelvis avec injection de produit de contraste (ZCQH001+ ZBQH001) (n <sub>moy</sub> = 1,14 acq. / exam.)	1232	25,8	Seins	30
Utérus			20	
Ovaires			20	
Organes situés dans la zone explorée			25	
Testicules <sup>(1)</sup>			10	
Thorax et abdomen avec injection de produit de contraste (ZCQH002+ ZBQH001) (n <sub>moy</sub> = 1,3 acq. / exam.)	836	18,9	Seins	30
Organes situés dans la zone explorée			25	
Utérus <sup>(1)</sup>			3	
Ovaires <sup>(1)</sup>			3	
Testicules <sup>(1)</sup>			0,1	

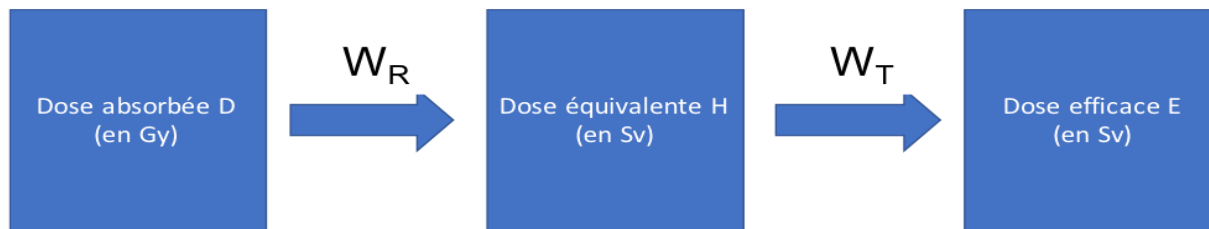
<sup>(1)</sup> : organe considéré hors zone explorée

**Tableau 1** : Doses moyennes aux organes pour un acte scanographique complet chez l'adulte (60 à 80kg), Calculées à partir des PDL<sub>moy</sub> et des CTDI<sub>moy</sub> à l'aide du logiciel CT<sub>expo</sub><sup>59</sup>

### 2.2.2.2 Dose efficace et ses liens avec les indicateurs précédents

**La dose équivalente** : Exprimée en Sievert (Sv), la dose équivalente prend en compte la nature du rayonnement. On obtient la dose équivalente H en multipliant la dose absorbée par le facteur de pondération W<sub>R</sub>. Pour les rayons X utilisés en scanner, le facteur de rayonnement est égal à 1.

**La dose efficace** : Également exprimée en Sievert (Sv), la dose efficace prend en compte la nature du tissu exposé. On obtient la dose efficace E en multipliant la dose équivalente par le facteur de pondération  $W_T$ . La somme des facteurs tissulaires est égale à 1, ce qui correspond au facteur tissulaire d'une irradiation corps entier.



**Figure 7** : Schéma explicatif du calcul de la dose efficace E

Organe ou tissu	Facteur de pondération tissulaire $w_T$	
	CIPR n° 60	CIPR n° 103
Gonades	0,20	0,08
Moelle osseuse	0,12	0,12
Colon	0,12	0,12
Poumons	0,12	0,12
Estomac	0,12	0,12
Vessie	0,05	0,04
Seins	0,05	0,12
Foie	0,05	0,04
Œsophage	0,05	0,04
Thyroïde	0,05	0,04
Surface osseuse	0,01	0,01
Peau	0,01	0,01
Cerveau	dans les organes restants	0,01
Glandes salivaires	0	0,01
Organes restants <sup>(1)</sup>	0,05	0,12

<sup>(1)</sup>CIPR n° 60 : glandes surrénales, cerveau, reins, muscles, pancréas, intestin grêle, rate, thymus, utérus.

CIPR n° 103 : glandes surrénales, région extra-thoracique, vésicule biliaire, cœur, reins, ganglions lymphatiques, muscles, muqueuse buccale, pancréas, prostate, intestin grêle, rate, thymus, utérus.

**Tableau 2** : Facteurs de pondération tissulaires  $W_T$  selon les publications n°60 et n°103 de la CIPR (les valeurs grisées indiquent les principaux changements entre les deux publications)

En scanographie, le calcul de la dose efficace peut se faire directement à partir du PDL en appliquant des facteurs de conversion globaux définis à partir des facteurs de pondération tissulaires  $W_T$  présenté ci-dessous.

**Dose Efficace E = PDL (mGy.cm) x Facteur de conversion (tableau ci-dessous)**

Zone anatomique	Facteur de conversion	
	mSv / (mGy.cm)	
	Avec les $w_T$ de la CIPR 60 [7]	Avec les $w_T$ de la CIPR 103 [9]
Tête	0,0021	0,0019
Cou	0,0059	0,0052
Tête et cou	0,0031	0,0028*
Thorax	0,014	0,015
Pelvis	0,015	0,013
Abdomen et pelvis	0,015	0,014
Thorax, abdomen et pelvis	0,015	0,014

**Tableau 3 :** Facteurs de conversion globaux permettant le calcul de la dose efficace à partir du PDL de l'examen scanographique, définis à partir des facteurs de pondération tissulaires des publications n°60 et n°103 de la CIPR<sup>59,60</sup>



En fonction de la zone explorée et de la prescription, de nombreux protocoles peuvent être utilisés et faire varier la dose efficace associée.

Examen	PDL <sub>moy</sub> (examen adulte, mGy.cm)*	E <sub>moy</sub> (mSv)	
		Selon la CIPR 60	Selon la CIPR 103
AP + IV	1300	20	18
AP sans IV	700	11	10
Angioscanner cérébral	1300	2,7	2,5
Angioscanner Membres Inférieurs	1450	22	19
Angioscanner TAP	1250	19	18
Angioscanner thoracique	670	9,3	11
Angioscanner TSA	1300	4,0	6,7
Cœur	680	9,6	10
Coloscanner	1350	20	19
Crâne + IV	860	1,8	1,6
Crâne sans IV	880	1,8	1,7
Dentascanner	320	0,7	0,6
Epaule sans IV	760	2,5	2,2
Foie/pancréas/rate	1550	23	22
Hanche	1040	16	14
Pelvimétrie	35	0,5	0,5
Rachis cervical sans IV	750	4,4	3,8
Rachis lombaire sans IV	770	12	11
Rochers	680	1,4	1,3
Sinus	220	0,5	0,4
TA + IV	1450	22	22
TAP + IV	1070	16	15
TAP sans IV	800	12	11
Thorax + IV	550	7,5	8,1
Thorax sans IV	380	5,3	5,7
Uroscanner	1000	15	14

\*valeur arrondies

**Tableau 4 : Doses efficaces moyennes associées aux examens de scanographie<sup>59</sup>**

### 2.2.2.3 Exemples de doses délivrées lors d'examens scanographiques

Les ordres de grandeur de doses pour les examens scanographiques les plus courants sont rappelés dans le tableau 5. On peut remarquer que le scanner est beaucoup plus irradiant que les radiographies classiques. En effet, un scanner du thorax est 440 fois plus irradiant qu'une radiographie du thorax en termes de dose efficace (0.015 vs 1.4).

Examination	Typical effective dose (mSv)	Equivalent number of chest X-rays	Equivalent period of natural background radiation *
Chest X-ray (single PA film)	0.015	1	2.5 days
Skull X-ray	0.07	5	12 days
Abdomen X-ray	0.4	30	2 months
CT head	1.4	90	7.5 months
CT abdomen	5.6	370	2.5 years
CT chest	6.6	440	3 years
CT chest, abdomen and pelvis	10	670	4.5 years
PET CT head	7	460	3.2 years
PET CT body	18	1200	8.1 years
* UK average = 2.2 mSv per year			

**Tableau 5 :** Exemples de doses efficaces typiques de procédures en radiodiagnostic avec leurs équivalences en nombre de radiographies du thorax et en temps d'exposition naturelle (ici la moyenne au Royaume-Uni 2.2 mSv/an)<sup>5</sup>

### 2.2.3 Évolution de l'utilisation du scanner et ses conséquences

Comme on l'a dit plus haut, depuis son invention dans les années 70, l'utilisation de la tomodensitométrie en milieu clinique s'est considérablement développée. Les premiers systèmes ont été conçus uniquement pour l'examen du cerveau et les premiers appareils corporels se limitaient à l'examen sélectif du tronc, surtout en ce qui concerne la prise en charge du cancer. Grâce à des évolutions technologiques, elle s'applique maintenant aux maladies de l'appareil locomoteur, du thorax, de l'abdomen et du bassin. L'acquisition rapide d'images avec une résolution spatiale impressionnante de grandes parties du corps donne une profusion d'informations

claires et spécifiques répondant à un large éventail de questions cliniques. Aucune autre procédure d'imagerie ne combine ces fonctionnalités en une seule modalité. L'utilisation clinique de la tomodensitométrie est de plus en plus courante aujourd'hui et contribue à une gestion plus efficace des soins : détermination de la nécessité d'une intervention chirurgicale ; réduction du recours à la chirurgie exploratoire ; amélioration du diagnostic, de la stadification et du traitement du cancer ; réduction de la durée des hospitalisations ; réduction des examens sous sédation (particulièrement chez les très jeunes patients) ; orientation des traitements pour les blessures, les maladies cardiaques et les accidents vasculaires cérébraux<sup>61</sup>, suivi de l'efficacité des traitements anti-cancéreux.

En d'autres termes, au fur et à mesure que cette modalité est devenue plus largement disponible, plus précise et plus rapide, son utilisation s'est considérablement développée à travers une multitude de situations cliniques, pas seulement limitées à la cancérologie. La principale conséquence en est une augmentation significative de l'exposition aux radiations ionisantes dans le cadre médical : environ le double en 5 à 10 ans. L'exemple le plus marquant est celui des Etats-Unis où le nombre d'examens scanographiques est passé de 18.3 millions en 1993 à 62 millions en 2006<sup>62</sup>. En Angleterre, selon les statistiques du site NHS ([www.nhs.uk](http://www.nhs.uk)), le nombre d'examens effectués chaque année dans les hôpitaux a régulièrement augmenté, passant d'un peu plus d'un million à près de 5 millions sur la même période. En France, le nombre d'examens annuels est de 9 millions environ et a augmenté de 12% depuis 2007<sup>6</sup>.

Comme on l'a dit plus haut, si le scanner est la technique radiodiagnostique la plus précise, elle est également la plus irradiante. En effet, en France même s'il ne représente que 10.4 % des actes réalisés, il contribue à 71.3% de la dose délivrée. A titre de comparaison, la radiographie conventionnelle (y compris dentaire) représente 87.8% des actes pour 17.9% de la dose <sup>6</sup>. En Angleterre, l'utilisation de la tomodensitométrie est responsable de 68 % de la dose collective totale provenant des examens radiologiques (40 % en 1997-1998) pour 7% des actes réalisés<sup>63</sup>.

Selon l'IRSN, la situation la plus courante est une contribution de l'exposition médicale, située entre 0 et 10 mSv/an<sup>3</sup>. En 2012, l'exposition médicale de la population est telle que : 56% des personnes n'ont pas été exposées ; 30.8% des personnes exposées ont reçu moins de 1mSv ; 8% ont reçu entre 1 et 10mSv et 5.2% ont reçu plus de 10 mSv.

Il existe également une forte variation de l'exposition, en fonction de l'âge (déjà observée en 2007) : Sur les personnes incluses dans l'étude, 18 % des moins de 5 ans ont été exposées au moins une fois en 2012 alors qu'au-delà de 50 ans, 50 % des personnes ont été exposées<sup>3</sup>. De plus, la répartition des actes diagnostiques selon la modalité d'imagerie et la zone anatomique explorée varie avec l'âge et le sexe. Avant 5 ans et pendant l'adolescence, l'exposition est principalement due à la radiologie conventionnelle et dentaire. La scanographie ne représente que 2% des actes pendant l'enfance et concerne majoritairement la tête et le cou<sup>64</sup>. A l'âge adulte, les actes de radiologie conventionnelle sont plus fréquents chez les femmes, avec en moyenne 20 % d'actes en plus que chez les hommes. Cet écart s'explique principalement par les mammographies. Les actes de scanographie et de médecine nucléaire sont nettement plus fréquents chez l'homme que chez la femme (+45 % d'actes de scanographie et +40 % d'actes de médecine nucléaire en moyenne). Ces écarts correspondent principalement à un excès de scanners thoraciques et abdomino-pelviens, ainsi que de scintigraphie cardiaques chez l'homme après 50 ans.

**L'augmentation des doses cumulées sur la vie est donc significative et pose question. L'Académie Nationale de Médecine rappelle « ...les conséquences des rayonnements ionisants qui, invisibles, ne suscitent pas la méfiance. Or, la radioprotection s'impose car l'effet des doses d'exposition reçues tout au long de la vie est cumulatif »<sup>65</sup>. L'allongement de la durée de vie de l'ensemble de la population fait que la radioprotection est devenue une question importante et récurrente pour tous les patients. Ceci est particulièrement vrai pour les enfants dont les effets nocifs potentiels de l'exposition aux rayonnements ont plus de risque d'apparaître (du fait d'une espérance de vie plus grande<sup>22,61</sup> et de augmentation régulière des doses durant ces dernières années<sup>66</sup>).**

## **2.2.4 Justification, optimisation et limitation de dose et augmentation des expositions liées au scanner**

Dans le cadre de l'augmentation significative des examens par scanner et de la dose cumulée, comment appréhender les principes de justification, optimisation et limitation de la dose ?

### **2.2.4.1 Justification de la dose et scanner**

Le principe de justification est le premier et le plus critique des principes de la radioprotection pour les examens de scanographiques<sup>67</sup>. La justification est de la responsabilité du demandeur et du praticien qui effectue l'examen de scanographie (réglementairement parlant, la responsabilité incombe au praticien qui réalise l'examen) et le processus doit être appliqué individuellement à chaque demande<sup>61</sup>. Selon la CIPR, la justification doit se faire à trois niveaux : de manière globale pour la modalité choisie, de manière spécifique en fonction du tableau clinique, et de manière personnalisée au patient, à sa situation médicale, psychologique et sociale<sup>67</sup>. La justification doit être effectuée par un personnel ayant une connaissance et une expérience adéquates de l'examen et disposant d'informations suffisantes et correctes sur les demandes, de sorte qu'un jugement pleinement éclairé puisse être rendu pour chaque cas individuel. La justification doit répondre à la question de savoir si l'investigation est nécessaire, si le scanner est la modalité la plus appropriée, si le patient a besoin de l'exploration du volume demandé et si une exposition réduite serait suffisante pour l'investigation. Il existe des lignes directrices cliniques qui donnent des conseils sur la voie d'investigation pertinente pour différentes maladies. La Société Française de Radiologie (SFR) a créé pour cela un outil informatique en ligne, le « guide du bon usage des examens d'imagerie médicale », qui oriente les professionnels de santé amenés à prescrire ou à réaliser des examens d'imagerie médicale. Il combine les indications pour des cas cliniques précis, le grade de preuves scientifiques lié à ces indications et le niveau de dose de l'examen (<http://gbu.radiologie.fr>). Toutefois, la recommandation d'utiliser le scanner pour une circonstance particulière ne signifie pas nécessairement que son utilisation est justifiée au niveau individuel<sup>61</sup>. Malgré ces outils mis à la disposition des praticiens, Bouette et al<sup>68</sup> ont montré que la pertinence des prescriptions d'imagerie n'est pas satisfaisante, en particulier dans le cas du scanner. En effet, 39 % des demandes étaient inappropriées et

dans 67 % des cas, un autre examen aurait été plus justifié. Dans 47 % des cas, il s'agissait d'une IRM. Compte-tenu du fait que l'étude portait sur des demandes d'examens déjà effectués, ce chiffre soulève de vives inquiétudes quant à l'exposition potentielle non justifiée des patients aux rayonnements ionisants.

Brenner et al, estime en 2007 que 20 millions d'adultes et surtout plus d'un million d'enfants par an aux États-Unis subissent des examens médicaux irradiant inutilement<sup>69</sup>. Comme le rappelle l'ASN, le scanner doit être remplacé dès que possible par des examens non-ionisants comme l'IRM. Cependant, le parc d'IRM étant plus faible que celui des scanners, les délais d'attente pour obtenir un rendez-vous sont encore trop longs<sup>70</sup>. D'autre part, de nombreuses enquêtes scientifiques ont clairement montré un déficit de connaissances chez les professionnels de santé tant sur le niveau de dose reçue en scanographie que sur les risques de l'imagerie diagnostique à long terme<sup>71-77</sup>. Lumbreras et al<sup>75</sup> rapportent en effet que près de 80 % des cliniciens interrogés n'avaient jamais entendu parler des recommandations européennes et que seulement 31,7% d'entre eux informent les patients sur les risques potentiels des rayonnements ionisants à long terme<sup>75</sup>. Une des explications les plus courantes est que les médecins considèrent souvent les scanners sous le même angle que les autres procédures radiologiques, même si les doses de rayonnement sont généralement plus élevées qu'avec les autres procédures radiologiques. Dans une étude menée auprès de radiologues et de médecins urgentistes, environ 75 % de l'ensemble du groupe ont sous-estimé de façon significative la dose de rayonnement provenant d'un scanner, et 53 % des radiologues et 91 % des médecins urgentistes ne croient pas que la scanographie augmente le risque de cancer<sup>77</sup>. Présenter l'information sous forme de tableau d'équivalence de doses en termes de radiographie pulmonaires et d'exposition naturelle pour chaque type d'examen donnerait une meilleure perception de l'exposition aux praticiens et aux patients<sup>75</sup> (Tableau 5). L'absence fréquente d'informations sur la dose reçue dans les comptes-rendus radiologiques (pourtant réglementaires en France) et l'absence de suivi de doses pour les patients participent également à ce manque d'information.

Il est cependant important de noter que tous les risques pour le patient doivent être considérés dans un contexte clinique. La plupart des scanners sont effectués à des fins de diagnostic ou pour suivre le traitement d'une maladie grave. Par exemple, en ce qui concerne le cancer du pancréas - avec une survie à 5 ans de 2 % - le risque lié à

l'irradiation est d'une importance minimale pour l'espérance de vie. Cependant, d'autres types de cancers ont de meilleurs pronostics. Chez ces patients, bien qu'il y ait peu de difficulté à justifier un scanner initial, de multiples examens de suivi peuvent augmenter la dose de radiation et donc le risque associé, ce qui nécessite un examen attentif, surtout s'il y a une perspective de guérison. Le tout est de déterminer si l'information supplémentaire fournie par le scanner est pertinente pour la prise en charge de ces patients<sup>61</sup>. Un examen n'est finalement justifié que s'il modifie la prise en charge du patient.

#### **2.2.4.2 Optimisation de la dose et scanner**

La base du processus d'optimisation est à la charge du radiologue. Le but est d'obtenir une qualité d'image acceptable en vue d'un diagnostic fiable sans dose de rayonnement excessive. Cependant, il n'y a pas de définition ni de paramètre reflétant un objectif de qualité diagnostique et d'image adéquate. Cela dépend de la tâche clinique (l'organe critique à investiguer), de la formation, des préférences et de la culture radiologique de chaque praticien, faisant de l'optimisation un réel défi pour chaque service de radiologie.

Le type d'intervention à réaliser, la zone du corps à balayer, le volume à explorer influencent l'exposition et l'optimisation à mettre en place. Ainsi, pour un même type d'examen, on observe une grande disparité des doses délivrées entre différents pays, hôpitaux et même parfois au sein du même service<sup>5,32,78,79</sup>. Le PDL médian varie d'un facteur 1,2 à 5 entre les différentes installations même si récemment ces différences se sont atténuées en France<sup>80</sup>. Ceci est principalement dû à la manière d'utiliser les machines (haute tension, charge, pitch, répétition d'acquisition moyen...), plutôt qu'au patient, au fabricant ou au modèle de scanner<sup>32,81</sup>. De plus, il y a une tendance à étendre la zone d'imagerie au-delà de la zone d'intérêt avec la conséquence d'une dose supplémentaire associée. Des études ont démontré que dans environ 98 % des examens de tomodensitométrie thoracique, abdominale ou pelvienne, le volume imagé est plus grand que le volume d'intérêt réel, avec une dose supplémentaire associée<sup>82-84</sup>. Même si on note une amélioration récente, une dose supplémentaire non négligeable reste systématiquement associée à cette pratique d'« over scanning »<sup>85,86</sup>.

Depuis le début du siècle, les fabricants mettent au point des technologies de réduction des doses. La modulation automatique du tube (modification de mAs) en fonction du patient, la sélection automatique du potentiel du tube en fonction de l'examen réalisé et de la région corporelle explorée ainsi que les algorithmes de reconstructions itératifs sont des outils efficaces quand ils sont disponibles<sup>87</sup>. Il convient toutefois de noter que certaines de ces caractéristiques de réduction de la dose ne sont disponibles que sur les scanners plus récents et que l'utilisation d'anciens appareils peut entraîner une dose beaucoup plus élevée pour le patient<sup>61</sup>.

D'autres initiatives comme les déploiements de système DACS (*Dosimetry Archiving and Communication System*) peuvent aider les services de radiologie pour l'optimisation. Le DACS est présenté comme le pendant du PACS (*Picture Archiving and Communication System*) pour la gestion de la dose reçue par les patients. Ce système collecte et analyse les données dosimétriques en obtenant un échantillon significatif de patients dans le but d'améliorer la force des statistiques de dosimétrie, pour un examen, un protocole, ou l'ensemble de l'activité d'une modalité d'imagerie. Il guide les acteurs de la radioprotection dans l'optimisation de la dose, en étudiant, par exemple, un compromis entre la qualité de l'image et la dose utilisée. Le DACS est également un outil d'aide pour les équipes médicales, à travers l'automatisation du transfert des doses vers le compte rendu de l'examen, voire le dossier du patient et ainsi compenser le manque d'informations évoqué dans le paragraphe concernant la justification. En pratique, une solution logicielle de ce type permet aux radiologues d'obtenir des données pour comparer l'utilisation de leurs machines. Ils peuvent ainsi adapter leurs protocoles d'acquisition de l'image pour chaque machine et obtenir une meilleure optimisation de dose sur un même scanner en une année. Il permettra, à terme, de réduire significativement les doses reçues par la population concernée par l'irradiation dans le domaine médical. Son déploiement est d'ailleurs recommandé par l'ASN<sup>48</sup> car l'optimisation des protocoles est souvent considérée comme l'un des besoins les plus urgents dans la pratique moderne du scanner.

Il devrait également être possible d'optimiser les doses en fonction d'une norme plus uniforme, tant à l'intérieur des pays qu'entre eux. Les recherches futures devraient se concentrer sur la compréhension des facteurs qui motivent les institutions et sur la comparaison scientifique des différentes approches pour l'optimisation<sup>81</sup>.



Enfin, un plan de formation continue est impératif pour assurer une optimisation continue, non seulement pour l'optimisation des images, mais aussi pour l'optimisation des doses. Cette approche devrait être appliquée pendant toute la durée de vie de l'équipement.

#### **2.2.4.3 Limitation de la dose en scanner**

La limitation réglementaire des doses existant pour les travailleurs exposés (20 mSv/an) et les individus du public (1 mSv/an) ne s'applique normalement pas aux rayonnements ionisants à des fins médicales. De plus, aucun outil ne permet actuellement de suivre les doses reçues dans le cadre du radiodiagnostic comme c'est le cas pour les travailleurs avec notamment le système d'information pour la surveillance de l'exposition aux rayonnements ionisants (SISERI). Le déploiement d'un tel système serait compliqué à mettre en place mais c'est une des recommandations de l'Académie Nationale de Médecine, qui suggère un suivi des doses tout au long de la vie des patients via un dossier lié à la Carte Vitale<sup>65</sup>.

Cependant, afin de renforcer le principe d'optimisation, des niveaux de référence diagnostique (NRD) ont été introduits dans la publication 73 « protection et sûreté radiologique en médecine »<sup>88</sup> de la CIPR et appliqués en France par l'arrêté du 24 octobre 2011. Cet arrêté oblige les chefs des services de radiologie et de médecine nucléaire à procéder à des évaluations dosimétriques périodiques et de transmettre ces résultats à l'IRSN. Les NRD constituent un outil mais ne doivent pas être assimilés à des « limites de dose » ou des doses optimales ». Ils sont établis pour des examens standardisés et des patients-types et ne devraient pas être dépassés sans justification pour des procédures courantes. Les NRD, fixés au 75<sup>ème</sup> percentile de la distribution des doses, sont des indicateurs dosimétriques de la qualité des pratiques destinés à identifier les situations nécessitant une action corrective en cas de dépassement ([www.irsn.fr](http://www.irsn.fr)).

L'Arrêté du 23 mai 2019 portant homologation de la décision n°2019-DC-0667 de l'ASN du 18 avril 2019 relative aux modalités d'évaluation des doses de rayonnements ionisants délivrées aux patients lors d'un acte de radiologie, de pratiques interventionnelles radioguidées ou de médecine nucléaire a mis à jour les NRD (NOR : SSAP1915191A).

Cet arrêté du ministre chargé de la santé du 2 mai 2019 a été publié au Journal Officiel de la République Française. Il est entré en vigueur le 1<sup>er</sup> juillet 2019.

Actes	Niveau de référence diagnostique		Valeur guide diagnostique	
	IDSV (mGy)	PDL (mGy.cm)	IDSV (mGy)	PDL (mGy.cm)
Encéphale	46	850	40	725
Sinus de la face	14	250	*	*
Thorax	9,5	350	7,5	275
Thorax-abdomen	11	550	9,5	475
Abdomen-pelvis	13	625	11	525
Thorax-abdomen-pelvis	11	750	9,5	650
Cœur (synchronisation prospective à l'électrocardiogramme (ECG))	26	375	18	325
Cœur (synchronisation rétrospective à l'ECG)	44	875	30	550
Rachis lombaire	28	725	23	625

\* Pas de VGD pour ces actes

**Tableau 6 :** NRD et VGD en scanographie chez l'adulte pour une acquisition entrés en vigueur au 1<sup>er</sup> Juillet 2019. Le VGD est une valeur repère servant d'objectif pour l'optimisation.

Actes	0 à <10 kg (0 à 1 an)		10 à <20 kg (1 à 5 ans)		20 à <30 kg (5 à 10 ans)		30 à <50 kg (10 à 18 ans)	
	IDSV (mGy)	PDL (mGy.cm)	IDSV (mGy)	PDL (mGy.cm)	IDSV (mGy)	PDL (mGy.cm)	IDSV (mGy)	PDL (mGy.cm)
Encéphale	20	320	22	360	26	470	*	*
Rochers	*	*	43	240	51	330	*	*
Thorax	1,1	20	1,3	26	1,4	40	*	*
Abdomen-pelvis	*	*	2	65	2,5	95	4	180

\* Pas de NRD pour ces actes

**Tableau 7 :** NRD en scanographie pédiatrique, selon les catégories de poids (kg), pour une acquisition entrée en vigueur au 1<sup>er</sup> Juillet 2019. L'âge est donné à titre indicatif.

Actuellement en scanographie, le taux de participation à la transmission des NRD est de 80%<sup>89</sup>. Cependant, on peut considérer que les établissements qui transmettent leurs données NRD sont parmi les plus sensibilisés à la radioprotection des patients alors que les moins attentifs à cet aspect ne réalisent probablement pas d'évaluations dosimétriques et ne transmettent pas de données<sup>48</sup>. Il est important de noter que les NRD ne sont indiqués que pour une seule acquisition. Le rôle de la scanographie dans la prise en charge clinique de certaines maladies peut aboutir à un grand nombre d'examens pour

un même patient<sup>90-92</sup>. Cela peut atteindre 10 examens au cours d'une seule maladie<sup>90</sup>. De plus, dans la configuration actuelle des NRD, un service peut avoir des pratiques qui soient en accord avec les valeurs de dose de référence mais réaliser un nombre d'acquisitions non optimisées. Même si le nombre moyen d'acquisitions varie entre 1 et 2,6 au sein du même examen, il peut atteindre 9 hélices dans certains cas<sup>32</sup>. C'est pourquoi, le Produit Dose Surface (PDS) en radiologie ou le Produit Dose Longueur (PDL) en scanographie pour les examens complets devraient être proposés en complément des NRD<sup>48</sup>. Seuls les NRD pourraient permettre une optimisation des doses délivrées aux patients. Cependant, ces NRD devraient alors être établis par indication clinique et non par zone anatomique. En effet, de nombreux protocoles existent en fonction de la prescription et les doses délivrées peuvent varier pour une même région corporelle<sup>32</sup>. Certains travaux récents proposent de nouveaux indicateurs en prenant en compte ces paramètres et en ajoutant également la morphologie du patient<sup>93</sup>.

**Plusieurs axes d'amélioration sont nécessaires pour chacun des principes de radioprotection en scanographie. L'évolution des pratiques passe par une analyse et une uniformisation de ces dernières. L'enseignement de la radioprotection doit être renforcé grâce à une meilleure formation, que ce soit pour les professionnels de santé mais aussi pour le grand public afin de responsabiliser les demandeurs d'examens et obtenir une adhésion volontaire de tous les acteurs<sup>48,65</sup>.**

### **2.3 Données épidémiologiques et modèles de risque**

Malgré des décennies de recherche sur les effets biologiques et cliniques des radiations ionisantes, il subsiste de nombreuses incertitudes quant à la quantification du risque et plus particulièrement pour les faibles et les très faibles doses (définies comme étant inférieures à 100 mGy)<sup>94,95</sup>. Au centre des débats sur les faibles doses se trouve la question des risques de cancers radioinduits. En plus d'un intérêt scientifique, cette question soulève des interrogations dans la société, notamment à cause de la place prise par l'exposition médicale aux radiations dans notre quotidien (voir chapitres précédents). La tâche des épidémiologistes n'a pas été facile car en plus du caractère nécessairement rare des événements radioinduits après faibles doses, s'ajoute le caractère stochastique de la carcinogénèse. Ainsi, l'approche privilégiée des épidémiologistes depuis les années

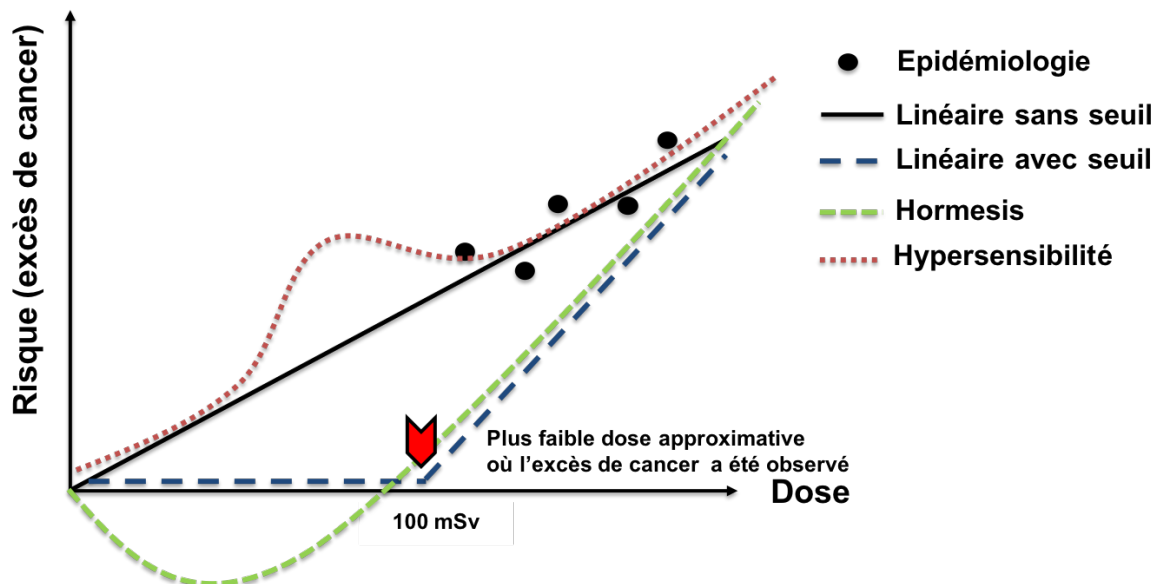
50 est d'avoir considéré des très grandes cohortes d'individus irradiés sans pour autant tenir compte du facteur individuel : 2 modèles de risque sous la forme de 2 relations dose-effet s'imposèrent alors : le modèle linéaire sans seuil (Linear No-Threshold model : LNT) et le modèle non-linéaire avec seuil (Non-Linear Threshold model : NLT).

### **2.3.1 Les différents modèles d'évaluation du risque radioinduit**

Le modèle linéaire sans seuil (Linear No-Threshold model : LNT), est basé sur l'hypothèse que le risque est strictement proportionnel à la dose et n'est nul qu'en l'absence d'irradiation : c'est la forme mathématique du principe de précaution. Le LNT a été adopté par la CIPR à la fin des années 1950 et au début des années 1960<sup>96</sup> à la fois pour des questions pratiques de simplification, pour des raisons de prudence face au manque de modèles mécanistiques de réponse aux radiations et de carcinogénèse mais surtout pour des raisons historiques liées à la personnalité de Hermann Müller et son discours de réception pour son prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 1946<sup>97</sup>. L'utilisation de ce modèle est toujours préconisée<sup>30,60,98,99</sup>. Soutenant un risque radioinduit non-négligeable même pour les très faibles doses, le modèle LNT est à l'origine du principe de radioprotection ALARA (« As Low As Reasonably Achievable »).

En analysant les retombées des bombes d'Hiroshima et Nagasaki qui restent encore à ce jour les cohortes les plus documentées des effets des radiations, il apparut que l'incidence des cancers pour des faibles doses pouvait être sur-estimée par le modèle LNT. Un deuxième modèle avec seuil fut donc proposé (Non Linear Threshold model : NLT) sur la base d'un risque toujours proportionnel à la dose mais seulement à partir d'un certain seuil de dose. En-deçà du seuil, le risque pouvait être considéré comme négligeable. C'est à partir du développement du modèle LNT qu'une controverse sur le risque lié aux faibles doses commença véritablement. Alors que les données de Hiroshima montraient un seuil de risque à 100 mSv pour les leucémies et à 200 mSv pour les cancers solides radioinduits, tout l'enjeu des discussions résidait dans la mesurabilité et la significativité des risques associées à des doses inférieures à ces seuils. Il existe des données épidémiologiques montrant une augmentation du risque de cancer à partir de doses situées entre 10 mSv et 50 mSv délivrées en une irradiation unique et de doses de l'ordre de 50 à 100 mSv délivrées en plusieurs fois ou sur une longue période<sup>100,101</sup>.

En plus de ces deux modèles, d'autres phénomènes spécifiques aux faibles doses rendent l'évaluation des risques encore plus complexe. L'hypothèse de l'*hormésis* soutient que l'exposition à des doses inférieures à 100 mSv pourrait diminuer le risque de cancer, soutenant donc un effet bénéfique des radiations<sup>102,103</sup>. Au contraire, le phénomène d'*hypersensibilité aux faibles doses* suggère un effet plus délétère pour une fenêtre de doses centrée sur 100-200 mSv<sup>104</sup>. Ces deux hypothèses créent ainsi des discontinuités notables dans la relation dose-effet, mettant à mal la validité des modèles NLT et LNT. Toutefois, la communauté scientifique semble encore négliger ces deux hypothèses - surtout la dernière - et la controverse entre les pro-NLT et les pro-LNT se fit presque indépendamment des progrès sur les connaissances de ces deux effets spécifiques des faibles doses.



**Figure 8 :** Schéma des différents modèles de risque aux expositions aux faibles doses d'irradiation

**Tous ces phénomènes remettent donc en cause la linéarité de la description du risque dans cette gamme de doses faibles dans laquelle se trouve le radiodiagnostic. Par ailleurs, ces deux phénomènes apparaissent très progressivement liés au facteur individuel, notion qui ne rentrait pas en compte dans les débats sur les faibles doses<sup>105</sup>. Nous traiterons de ces deux phénomènes dans la partie consacrée aux connaissances en radiobiologie. Toutefois, la controverse entre pro-LNT et pro-NLT illustre bien aujourd'hui l'enjeu sociétal de la résolution des énigmes liées aux effets des faibles doses de radiation.**

## **2.3.2 Données épidémiologiques**

Avec l'augmentation du nombre d'examens scanographiques réalisés ces dernières années, la question des effets à long terme d'une exposition aux radiations liée au scanner est devenue cruciale. Plusieurs études épidémiologiques ont tenté de répondre à cette question. Elles sont principalement focalisées sur le risque de cancer radioinduit, bien que des cataractes<sup>106</sup> et des effets sur le système cardiaque aient été évoqués.

### **2.3.2.1 Évaluation du risque sur la cohorte des survivants d'Hiroshima et Nagasaki**

Sur la base du modèle LNT, plusieurs évaluations quantitatives de risque induit par les examens de scanographie ont été réalisées<sup>12,107-110</sup>. Cependant, ces projections reposent sur des extrapolations de risque basées essentiellement sur la cohorte Life Span Study (LSS) issue des survivants des bombes d'Hiroshima et de Nagasaki et non sur des expositions scanographiques où le débit, la dose et le spectre d'énergie sont différents<sup>23,25,26</sup>. Vu les enjeux et la rigueur méthodologique à appliquer pour mieux conclure sur la non-mesurabilité des effets ou l'absence de risque, une telle extrapolation entre les survivants des bombes et les scanners n'est plus acceptable. C'est pourquoi il était nécessaire de mener des études épidémiologiques directement sur des cohortes de patients exposés à des examens scanographiques.

### **2.3.2.2 Évaluation du risque sur des cohortes de patients en scanographie**

Pearce et al., ont publiés en 2012 une étude portant sur une cohorte de 180 000 individus ayant eu au moins un examen par scanographie avant l'âge de 22 ans entre 1985 et 2002<sup>15</sup>. Au total, 74 patients ont eu une leucémie et 135 une tumeur cérébrale après leur examen. Les auteurs ont calculé que le risque relatif de leucémie augmentait de 3,6 % par mGy supplémentaire reçu et celui d'un cancer cérébral de 2,3 % par mGy supplémentaire. Comparativement aux patients recevant une dose inférieure à 5 mGy, les patients recevant une dose moyenne cumulative de 50 mGy présentaient environ 3 fois plus de risque de développer une leucémie, tandis que ceux recevant une dose moyenne cumulative d'environ 60 mGy présentaient 3 fois plus de risque de développer une tumeur cérébrale.

Une autre étude publiée en 2013 par l'équipe australienne de Mathews, comparait l'incidence de cancer parmi 680 000 individus ayant bénéficié d'au moins un acte de scanographie avant l'âge de 20 ans entre 1985 et 2005, à celle observée parmi 11 millions d'individus n'ayant eu aucun acte de scanographie<sup>17</sup>. L'étude concluait à une augmentation significative de 24 % de l'incidence de cancers (quelle que soit leur nature), parmi les individus ayant eu au moins un acte de scanographie. Des excès de risque significatifs étaient cependant observés pour de nombreuses localisations tumorales (système nerveux central, système digestif, peau (mélanome), tissus mous, organes génitaux féminins, voies urinaires, thyroïde, leucémies, myélodysplasies, lymphomes). Pour les leucémies et les myélodysplasies, le taux d'excès estimé par mGy était de 3,9 et de 2,1% pour le cancer du cerveau. Ces deux taux sont comparables aux estimations de Pearce et al., 2012<sup>15</sup>. Cette étude est la plus vaste menée à ce jour sur l'exposition aux rayonnements médicaux à des fins diagnostiques et elle suggère des signes d'augmentation d'autres cancers en plus des leucémies, des myélodysplasies et des cancers du cerveau après une exposition aux rayonnements ionisants en scanner.

Une troisième étude, réalisée à Taiwan et publiée en 2014, comparait le risque de cancer parmi plus de 24 000 patients de moins de 18 ans ayant eu un scanner du crâne entre 1998 et 2006, à celui de 98 000 individus affiliés au même régime d'assurance-maladie n'ayant pas eu ce type d'examen pendant la même période<sup>13</sup>. Les individus qui souffraient de syndromes de prédisposition au cancer étaient exclus de l'étude. L'incidence tous cancers confondus, de tumeurs malignes du système nerveux central et de leucémies, ne différait pas entre les deux populations mais les auteurs concluaient à un risque de tumeurs cérébrales 3 fois supérieur pour les individus ayant eu un examen scanographique de la tête par rapport aux individus non exposés.

Journy et al ont publié en 2015 une étude réalisée en France portant sur 70 000 enfants exposés au scanner avant l'âge de 10 ans sur la période 2000-2010<sup>25</sup>. Cette étude bénéficiait d'une estimation dosimétrique à partir des protocoles radiologiques utilisés dans les services durant la période d'étude ainsi que d'informations cliniques sur des facteurs de prédisposition au cancer (facteur génétique ou immunodéficience acquise). La disponibilité de données cliniques à partir des bases PMSI avait permis d'identifier que 3 % des enfants inclus dans la cohorte présentaient un facteur de prédisposition. Le suivi

moyen était de 4 ans. Les cancers incidents les plus fréquents étaient les tumeurs du système nerveux central (27 cas), les leucémies (25 cas) et les lymphomes (21 cas). Les enfants ayant un facteur de prédisposition au cancer représentaient 32 % des cas diagnostiqués. Le risque de tumeurs du système nerveux central et de tumeurs hématopoïétiques n'était pas significativement augmenté en fonction de la dose cumulée reçue, respectivement, au cerveau et à la moelle osseuse. Les coefficients de risque estimés étaient cependant tout-à-fait compatibles avec les estimations obtenues dans les précédentes études. Dans cette étude une augmentation du risque radioinduit, bien que non statistiquement significative, était suggérée chez les enfants sans facteur de prédisposition, alors que le risque était proche de zéro chez les enfants avec facteur de prédisposition.

En 2015, une étude réalisée en Allemagne, portait sur une cohorte de 45 000 enfants ayant été exposés au scanner avant l'âge de 15 ans sur la période 1980-2010<sup>11</sup>. Le suivi moyen était de 4 années. Au total, 46 cas de cancer survenus avant l'âge de 15 ans ont été identifiés : 12 leucémies, 13 lymphomes, 8 tumeurs du système nerveux central, 13 cancers solides (autres que les tumeurs cérébrales). Les auteurs retrouvaient une augmentation significative de l'incidence de cancer « toutes localisations confondues » dans la cohorte par rapport à l'incidence observée dans la population générale avec un nombre de cancers multiplié par 2. Ce doublement du risque de cancers « toutes localisations confondues » serait principalement dû à une augmentation du risque de lymphome, sans augmentation significative du risque de leucémies et de tumeurs du système nerveux central. Une augmentation significative du risque de tumeurs du système nerveux central avec la dose cumulée au cerveau était observée mais ces résultats reposaient sur un nombre très faible de cas.

En 2019, une étude a été réalisée aux pays bas sur 168 394 enfants ayant reçus un scanner ou plus entre 1979 et 2012 avant l'âge de 18 ans dans 42 hôpitaux<sup>9</sup>. Les auteurs retrouvaient, pour une dose cumulée au cerveau de 38.5mGy, une augmentation significative du risque de tumeurs malignes et non-malignes combinées de 0.86 (ERR/100mGy). En revanche, il n'y avait pas de risque de leucémie associé pour une dose cumulée de 9.5 mGy à la moelle osseuse.



En résumé, l'ensemble des résultats publiés à ce jour suggère une augmentation du risque de cancer radioinduit après examen par scanographie dans l'enfance, en particulier de tumeurs du système nerveux central et de leucémies. Ces estimations correspondent néanmoins à des risques absolus faibles compte-tenu de la rareté des cancers chez les jeunes enfants : de l'ordre de 1 cas de tumeur du système nerveux central et 1 cas de leucémie pour 10 000 examens de la tête avant 10 ans dans les 10 années suivant l'exposition<sup>15</sup>.

En comparaison des résultats issus des calculs effectués sur la cohorte des survivants d'Hiroshima et de Nagasaki, les excès de risque estimés par unité de dose sont très similaires pour les leucémies mais beaucoup plus élevés pour les tumeurs cérébrales. Rappelons d'ailleurs la spécificité de ces 2 localisations. Les explosions des bombes de Hiroshima et Nagasaki ont provoqué une exposition non-ciblée et peuvent être modélisées comme des expositions « corps entier », ce qui peut expliquer le cas particulier des leucémies et lymphomes, issus du système vasculaire qui domine en surface et en volume d'interaction avec le rayonnement. A travers un examen scanographique qui est basé sur une irradiation volumique et qui en plus, est souvent associé à l'injection intraveineuse de produit de contraste, cette prédominance des effets radioinduits sur le système vasculaire reste toujours valable. A l'inverse, l'incidence des cancers du système nerveux central radioinduits pour les survivants de Hiroshima et Nagasaki est comparable à celle d'autres cancers solides radioinduits. L'incidence observée sur des enfants ayant subi un scanner ne peut s'expliquer ici que par une irradiation sélective de l'encéphale, ce qui est le cas puisque la plupart des études précitées se sont focalisées sur le suivi de patients ayant subi un scanner de la tête. Ainsi, on peut comprendre les différences « qualitatives » qui peuvent exister entre les survivants de Hiroshima et Nagasaki et les patients ayant subi un scanner. Toutefois, cette discussion ne nous éclaire pas sur les excès de risque observé après de telles faibles doses.

**A l'évidence, des biais méthodologiques liés à la prise en compte de l'indication des examens, à l'évaluation rétrospective des doses reçues, à la non-connaissance du statut génétique du patient et/ou à un manque de puissance statistique limitent la portée des résultats obtenus**

### **2.3.2.3 Limite de la portée des études épidémiologiques publiées**

#### **2.3.2.3.1 Temps de suivi**

Les durées moyennes de suivi de ces études sont très courtes (<10ans)<sup>11,13,15,17,25</sup>. Or, les cancers radioinduits, notamment des tumeurs solides, peuvent s'exprimer sur plusieurs décennies après l'exposition. Le suivi à très long terme de ces cohortes est donc indispensable et devrait, en dépit des difficultés pratiques, être à la base de toute étude épidémiologique.

#### **2.3.2.3.2 Recueil des doses**

Les doses individuelles délivrées en scanographie peuvent être très variables<sup>111</sup>. Cependant, aucune dosimétrie individuelle réelle n'a été recueillie et utilisée pour les individus des cohortes examinées<sup>11,13,15,17,111-114</sup>. Les doses ont été estimées pour le site d'irradiation et étaient basées sur les expositions individuelles moyennes pour divers types d'examen à partir des données d'enquête nationale. Les doses annuelles et cumulatives ont été estimées pour chaque membre de la cohorte, et la dose cumulative était basée sur la somme de toutes les expositions scanographiques connues. L'utilisation de données d'enquête nationales pour estimer les caractéristiques des scanners pour des procédures individuelles sur une longue période n'apparaît pas rigoureuse. Les doses provenant des scanners conventionnels et hélicoïdaux sont très différentes, et le type de scanner n'était connu pour aucun patient en particulier. Pour la plupart des études, il existe un problème reconnu de documentation incomplète du nombre d'examens de tomodensitométrie effectués. En général, aucune dose provenant d'autres examens médicaux et dentaires n'a été prise en compte. Aucune analyse officielle de l'incertitude n'a été effectuée pour aucune des études de dosimétrie en scanner<sup>115</sup>.

### 2.3.2.3.3 Indications cliniques

Un des autres biais possibles de ces études est le phénomène de « *causalité inverse* ». En effet, si l'indication de l'examen indique une suspicion de tumeur ou de pathologie prédisposant au cancer, elle peut être en cohérence avec les excès de risque observés après l'exposition. La prise en compte de la prescription est donc essentielle pour ne pas biaiser les résultats, d'autant que la scanographie est utilisée dans le cadre de bilans diagnostiques tumoraux. De plus, le délai peut être long entre les premiers signes cliniques menant aux examens et le diagnostic définitif, particulièrement pour les tumeurs cérébrales. En revanche, pour les leucémies et les lymphomes, ce biais est *a priori* plus faible dans la mesure où les délais de diagnostic sont beaucoup plus courts et la scanographie généralement pas utilisée pour diagnostiquer une leucémie. Une autre étude soutient le fait que ce biais peut avoir une importance variable selon le type de cancer étudié<sup>116</sup>.

L'application de période d'exclusion permet de réduire la causalité inverse en ne prenant pas en compte les cancers survenus dans un délai trop court après l'examen étudié et qui pourraient être dus à la pathologie ayant justifié ce dernier.

Huang et al.,<sup>13</sup> ont exclu de leur population d'étude les enfants avec un facteur de prédisposition aux tumeurs cérébrales. Cependant les critères d'exclusion utilisés ainsi que le nombre d'enfants concernés n'étaient pas précisés. Krille et al.,<sup>11</sup> disposaient des informations cliniques pour une majorité des cas de cancers et pour un sous-groupe de patients sans cancer. Mais le faible effectif ne permettait pas de prendre en compte ces informations dans les analyses statistiques. Dans la cohorte de Journy et al.,<sup>111</sup> l'identification des enfants à risque de cancer a été réalisée grâce aux données PMSI (programme médicalisé des systèmes d'informations) et aux données des registres de cancers pédiatriques. Elle a permis de mettre en évidence un risque de cancer associé à l'exposition radiologique supérieur chez les enfants sans prédisposition au cancer par rapport aux enfants avec prédisposition, en ce qui concerne les premières années de suivi. Ceci peut être liée à une mortalité précoce dans ce groupe<sup>117</sup>.

Cette brève revue de la littérature suggère la nécessité d'identifier les facteurs de prédisposition dans les analyses sur le risque de cancer après exposition au scanner<sup>111</sup>.

#### **2.3.2.3.4 Le projet EPI-CT : une étude importante très attendue**

Le projet EPI-CT est une étude collaborative internationale rassemblant des études nationales déjà en cours en France, en Allemagne, en Espagne, en Suède et au Royaume-Uni, et des études complémentaires dans quatre autres pays européens. L'étude EPI-CT a recruté un total d'environ 950 000 patients qui avaient subi un scanner au moins une fois avant l'âge de 22 ans. Les patients feront l'objet d'un suivi au fil du temps (10 ans en moyenne) afin d'obtenir une information sur l'incidence de leucémie, des tumeurs cérébrales et peut-être d'autres cancers. Une méthodologie a été mise au point pour reconstituer les doses individuelles aux organes et estimer les incertitudes associées, en utilisant les données disponibles dans les systèmes d'archivage électronique des services de radiologie des hôpitaux participants. Les biais liés à l'indication des examens ainsi qu'au milieu socio-économique seront également pris en compte<sup>118,119</sup>.

#### **2.3.2.4 Importance de l'âge à l'exposition**

Les études épidémiologiques en scanographie se sont focalisées principalement sur la population pédiatrique qui a théoriquement une espérance de vie plus longue que les adultes et au cours de laquelle les effets potentiellement liés à l'exposition aux rayonnements ont plus de chances d'apparaître<sup>22,61</sup>. Il est possible d'étudier le risque de cancer lié à l'exposition aux scanners chez les adultes mais des échantillons de l'ordre de 0,4 à 1,3 millions de personnes exposées sont nécessaires<sup>120</sup>. Le risque de cancer est cumulatif au cours d'une vie, avec une contribution due à chaque exposition au rayonnement. De nombreux cancers solides radioinduits ne seront pas détectés avant des décennies et, par conséquent, l'exposition aux rayonnements chez les personnes âgées ne présente pas le même niveau de risque que l'exposition des enfants. L'idée communément admise est que « *les enfants sont plus radiosensibles que les adultes* ».

Cette assertion soulève plusieurs questions :

- Lorsqu'on utilise le terme « radiosensible », qui est un des mots les plus couramment utilisés par les radiologues, radiobiologistes, radiothérapeutes et spécialistes de la radioprotection, il faut comprendre « radiosensibilité » comme un risque de cancer radioinduit. Cependant, ce terme a été défini historiquement comme illustrant la prédisposition aux réactions tissulaires radioinduites qui sont attribuables à la mort cellulaire et non aux cancers radioinduits, plutôt eux-mêmes attribuables à la transformation cellulaire et à l'instabilité génomique <sup>121</sup>. Or, les enfants ne sont pas plus à risque de réactions tissulaires, après radiothérapie par exemple, que les adultes<sup>122</sup>. Pour éviter toute confusion, notre groupe a proposé le terme de *radiosusceptibilité* pour désigner la prédisposition aux cancers radioinduits par opposition à *radiosensibilité* qui garde sa définition historique<sup>121</sup>. « *Les enfants sont plus radiosensibles que les adultes* » deviendrait alors « *les enfants sont plus radiosusceptibles que les adultes* »
- Toutefois, même avec ce changement, l'assertion n'est pas encore précise. En effet, cette phrase signifie également que, dès que l'on devient adulte, la radiosusceptibilité change : « on devient plus radorésistant ». On voit ainsi que la formulation n'est pas satisfaisante pour fixer une idée simple : « plus on est irradié tôt dans la vie, plus on a du recul pour mesurer les éventuelles conséquences d'une irradiation : un centenaire exposé à des faibles doses de radiations ne mourra certainement pas d'un cancer radioinduit alors qu'un nourrisson exposé pourra peut-être, au cours de sa vie, avoir un cancer radioinduit. On mesure l'imprécision d'assertions équivoques qui sont pourtant reprises par des institutions de référence : l'âge *per se* plutôt que l'âge à l'exposition a été considéré ; une confusion sémantique se rajoute à l'imprécision <sup>121</sup>. On perçoit ici toute l'importance de bien définir les termes, et notamment pour cette problématique des faibles doses aux enjeux multiples. On verra dans les chapitres suivants qu'il a fallu également fixer la définition des termes « *hormesis* » et « *réponse adaptative* » afin d'en mieux comprendre les phénomènes sous-jacents.

Penchons-nous maintenant sur la nature des cancers radioinduits qu'on pourrait rencontrer chez les enfants. Le comité UNSCEAR de 2013 relatif à l'effet des rayonnements ionisants sur les enfants, a examiné l'évolution des données scientifiques et noté que l'induction de tumeurs chez les enfants par rapport aux adultes est très variable et dépend du type tumoral, de l'âge et du sexe<sup>22</sup>. De façon générale, pour environ 25 % des types de tumeurs, les enfants sont nettement plus à risque de cancer. C'est notamment le cas de la leucémie et des cancers de la thyroïde, de la peau, du sein et du cerveau. En revanche, pour 75% des autres tumeurs radio-induites, les enfants ont la même radiosusceptibilité que les adultes et sont parfois même plus « radiorésistants »<sup>22</sup>.

Concernant les 25% des tumeurs radioinduites pour lesquelles les enfants sont nettement plus radiosusceptibles, l'UNSCEAR explique que ces différences, notamment concernant les tumeurs du cerveau, sont liés à l'état de développement physiologique de cet organe chez les enfants. Cette explication, reprise notamment par le 16<sup>ème</sup> rapport COMARE<sup>61</sup> et la Haute Autorité de Santé<sup>123</sup> s'inspire de la loi énoncée pour la première fois par Tribondeau et Bergonié en 1906<sup>124</sup> et qui stipule que la radiosensibilité d'un tissu est directement proportionnelle à sa vitesse de prolifération : « *plus un tissu prolifère vite, plus il est radiosensible* ». Notons d'ailleurs qu'historiquement, Tribondeau et Bergonié font bien référence à la radiosensibilité au sens de mort cellulaire après irradiation alors que les institutions citées plus haut citent leurs travaux pour les cancers radioinduits (radiosusceptibilité). Cette loi est également un principe historique fondateur de la radiothérapie, en considérant que les tumeurs sont plus radiosensibles que les tissus sains parce que les tissus sains se développeraient plus lentement. Notre groupe de recherche a montré que cette assertion est erronée<sup>125</sup>. En effet, les tumeurs ne sont pas nécessairement plus radiosensibles que les tissus normaux et leur taux de prolifération spontanée n'est pas nécessairement corrélé à la mort cellulaire après irradiation<sup>121,125</sup>. En effet, la loi de Tribondeau et Bergonié aurait dû être modifiée comme suit : Plus les cellules prolifèrent rapidement, plus la mort cellulaire apparaît rapidement. Mais ce sans rapport avec l'ampleur de la mort cellulaire observée après irradiation. De plus, les études sur le Tpot (paramètre du temps de doublement potentiel) ont montré que le rendement de la mort cellulaire n'est clairement pas corrélé au taux de prolifération<sup>126,127</sup>. Là encore,

il existe de nombreux contre-exemples de cette loi. Par exemple, les fibroblastes de patients souffrant d'ataxie télangiectasie (syndrome avec la plus forte radiosensibilité connue chez l'homme) sont plus radiosensibles alors que leur taux de prolifération *in vitro* est inférieur à celui des fibroblastes de patients sains beaucoup plus radiorésistants<sup>128</sup>. De même, certaines tumeurs très proliférantes peuvent être très radiorésistantes<sup>129</sup>. Enfin, à ce titre, reprenons l'argument de l'état de développement du cerveau des enfants repris par les institutions précitées : 1) les cellules en synthèse dans un cerveau, qu'il soit d'enfant ou d'adulte ne sont pas majoritaires et ne peuvent constituer une explication solide et validée quantitativement de la radioinductibilité des cancers cérébraux. 2) Si cet argument était vrai, on observerait systématiquement plus de cancers radioinduits de l'intestin (bien plus proliférant) que tout autre cancer. 3) Il apparaît que notre explication avancée en fin de section 2.3.2.2, à savoir l'irradiation sélective d'un organe associée ou non à un statut génétique de prédisposition serait plus compatible avec les données et notamment avec la différence entre les résultats sur les cohortes des survivants d'Hiroshima et ceux observées sur les cohortes d'enfants ayant subi un scanner de l'encéphale.

Baysson et al., 2016 rappelle que « les projections de risque reposent sur des extrapolations de risque impliquant de nombreuses hypothèses, notamment sur la forme de la relation dose-réponse, l'équivalence d'effets entre différentes sources d'exposition aux rayonnements ionisants, et la transposition de risque d'une population à une autre. De plus, elles reposent sur des modèles basés essentiellement sur les données concernant les populations exposées lors des bombardements de Hiroshima et Nagasaki qui disposent de peu d'information sur les risques de cancer dans l'enfance »<sup>23</sup>.

De plus, en cas d'exposition médicale, les enfants peuvent recevoir des doses significativement plus élevées que les adultes pour le même examen si les paramètres techniques ne sont pas spécifiquement adaptés. Étant donné que les enfants ont des diamètres corporels plus petits, des organes plus petits et qu'il y a moins de protection par les tissus de soutien pour une même exposition externe donnée, la dose aux organes internes des enfants sera plus élevée que pour un adulte. Or, rappelons qu'aucune étude épidémiologique concernant les expositions pédiatriques en scanographie n'a tenu compte des données individuelles sur la dose<sup>115</sup>. D'autres part, comme on l'a vu plus haut,

et malgré les évolutions réglementaires, l'optimisation des doses en scanographie reste à améliorer. On peut facilement imaginer que par le passé la marge de progression concernant ce principe fondamental de radioprotection était plus grande encore et que les examens pouvaient être bien plus irradiants qu'aujourd'hui.

**La différence des effets de l'exposition aux rayonnements en fonction de l'âge est une question complexe. Les modèles publiés et appliqués à presque tous les types de tumeurs qui supposent un risque relatif accru de cancérogenèse radioinduite chez les enfants par rapport aux adultes sont des généralisations, sans soutien scientifique documenté<sup>22</sup>. Cette brève revue de la littérature suggère plutôt l'importance des caractéristiques de l'exposition, de l'âge au moment de l'exposition, de la dose absorbée dans certains tissus, de l'âge au moment de l'évaluation et des effets radiobiologiques spécifiques des faibles doses dépendant fortement du facteur individuel. Actuellement, il n'existe pas de projections statistiquement satisfaisantes du risque sur toute la vie pour des sites tumoraux particuliers après une exposition à un jeune âge. Les estimations actuellement utilisées ne tiennent pas suffisamment compte des variations connues et des travaux supplémentaires sont nécessaires, comme le conclut l'UNSCEAR<sup>22</sup>. En effet, son comité scientifique reconnaît la nécessité de poursuivre les recherches pour déterminer l'ampleur et l'expression des effets et des risques liés à l'exposition pendant l'enfance par rapport à l'âge adulte. Par contre, les études à long terme qui suivront l'exposition des enfants seront confrontées à d'importantes difficultés en raison de l'absence de liens entre les dossiers médicaux, d'obstacles administratifs et politiques et de considérations éthiques et de protection de la vie privée. Ce sont d'importants défis qu'attendent les épidémiologistes. Pour les radiobiologistes, ils doivent aujourd'hui faire progresser les connaissances sur les effets spécifiques des faibles doses qui concernent les scanners et mettre en œuvre des méthodologies rigoureuses pour évaluer l'importance du facteur individuel qui est quasiment négligé par les épidémiologistes depuis 50 ans dans les descriptions mathématiques du risque.**

**Une revue de la littérature des connaissances en radiobiologie s'avère donc nécessaire : c'est l'objet du prochain chapitre.**



## 2.4 Rappels de radiobiologie

***Conformément à la politique de notre unité de recherche de délivrer un message clair et univoque pour les aspects essentiels de la réponse aux radiations, quelques chapitres pourront être communs à certaines thèses du laboratoire<sup>130</sup>.***

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. Sans être exhaustive, cette partie retrace l'essentiel des connaissances sur les événements radioinduits qui surviennent dans une cellule.

### 2.4.1 Des dépôts d'énergie aux dommages de l'ADN

#### 2.4.1.1 Échelle des temps en radiobiologie

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<sup>131</sup>. 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.

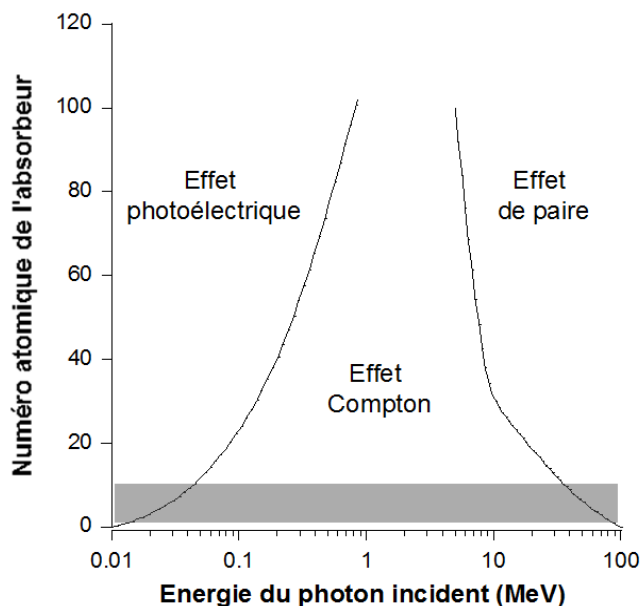
La nature des phénomènes radioinduits dépend également de l'intervalle de temps qui suit l'irradiation : les phénomènes sont généralement physiques, chimiques puis biologiques. Ils évoluent de l'échelle microscopique (atomes, molécules, cellules) à l'échelle macroscopique (tissu ou organe, individu, populations). Les événements qui se déroulent de  $10^{-18}$  à  $10^{-12}$  s après irradiation sont d'origine physique. L'irradiation entraîne la formation de *microdépôts d'énergie* aléatoirement répartis dans la matière. De  $10^{-12}$  à 1 s, les événements deviennent chimiques et 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  $\text{OH}^\circ$ , superoxydes  $\text{O}_2^-$ ) mais à durée de vie relativement limitée. Ensuite, se forment des produits de radiolyse plus stables comme notamment le peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$  (appelé eau oxygénée) capables de casser l'ADN<sup>132</sup>.

## 2.4.1.2 Événements physiques radioinduits

### 2.4.1.2.1 Principes généraux

La compréhension de la formation des dommages de l'ADN, événements-clés de l'effet biologique des radiations est l'un des principaux enjeux de la radiobiologie, d'où l'intérêt de bien connaître les événements radioinduits précoces. On peut distinguer 3 effets d'interaction rayonnement-matière : l'effet photoélectrique, l'effet Compton et la création de paires.



**Figure 9 :** Importance relative des effets d'interaction rayonnement-matière en fonction de l'énergie. D'après<sup>133</sup>. La zone grisée correspond aux numéros atomiques aux principaux composants organiques C, H, O N.

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)<sup>133</sup>. 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.

#### **2.4.1.2.2 Microdépôts d'énergie et notion de dose**

Couramment utilisée en radiobiologie, la notion de dose absorbée, montre toutefois ses limites pour apprécier un effet biologique. En effet, 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.

#### **2.4.1.2.3 Microdépôts d'énergie et méthode de Monte-Carlo**

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<sup>134</sup>. A partir de toutes ces études, les structures tridimensionnelles d'un nombre de trajets statistiquement représentatifs ont été analysées avec des dimensions inférieures à 1 nm<sup>135</sup>. 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*<sup>136,137</sup>. L'hypothèse de l'existence de *dommages multiples* ne résista pas non plus: la probabilité de formation de plusieurs types de dommages physiquement induits au même endroit est infime à des doses d'irradiation « raisonnables ». De telles hypothèses furent cependant populaires car elles correspondaient à la fois à des théories chimiques (effets directs et indirects) et biostatistiques (hypothèses sur le modèle linéaire-quadratique) elles-mêmes très populaires (voir plus loin). Par contre, on peut imaginer que des dommages de l'ADN, notamment des cassures, puissent être créées pendant la réparation des dommages radioinduits.

#### 2.4.1.2.4 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 ( $10^{-6} \text{ Gy}^{-1}$ ) : la probabilité de superposition de 2 trajets est donc négligeable, sauf pour des doses supérieures à  $10^5 \text{ Gy}$ , 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  $100 \text{ eV.nm}^{-3}$  correspond au nombre initial de CDB généralement observé <sup>136</sup>. Ce sont des événements rares.

#### 2.4.1.3 Événements chimiques et enzymatiques

##### 2.4.1.3.1 Effets directs ou indirects

L'une des grandes controverses de la radiobiologie est l'usage des termes « *effets directs* » et « *effets indirects* » pour décrire soit la formation immédiate ou différée de dommages de l'ADN, soit l'influence des molécules d'oxygène dans la formation d'espèces radicalaires. En particulier, la plupart des « radiobiologistes-physiciens » considèrent comme « directs » (=spontanés) les dommages induits par une particule primaire, et « indirects » (=différés dans le temps) les dommages induits par une particule secondaire (c'est-à-dire résultant de l'interaction entre la matière et la particule primaire). La plupart des « radiobiologistes-chimistes » considèrent les 2 types d'événements décrits précédemment comme spontanés. A l'inverse, ils définissent généralement comme « directs » les dommages produits par l'impact direct des particules primaires ou secondaires et « indirects » les dommages produits par la formation d'un radical oxydant produit par l'impact d'une particule. La confusion liée à l'usage de ces termes est d'autant plus grande que :

- les théories de l'impact de l'oxygène sur la formation des dommages de l'ADN ont été construites sur la base d'expériences réalisées dans des conditions bien peu

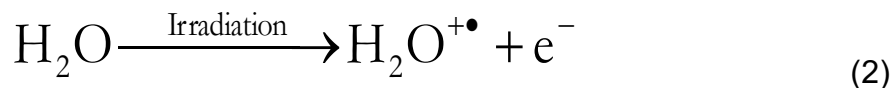
physiologiques (gaz sous haute pression ou usage d'antioxydants à dose toxique)<sup>138</sup>.

- les physiciens introduisent plutôt la notion de temps alors que les chimistes considèrent l'origine chimique de l'événement.

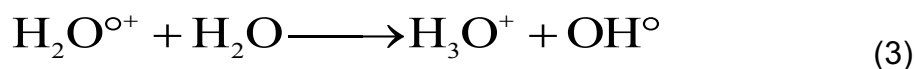
Dans un ouvrage collectif publié en 1991 par l'Organisation du Traité de l'Atlantique-Nord (OTAN), certains spécialistes proposaient déjà de proscrire l'usage des termes d'effets « directs » ou « indirects » car ils mêlent les descriptions d'événements physiques et chimiques complémentaires et non exclusives<sup>139</sup>. Ainsi, dans cette thèse, nous avons délibérément choisi d'éviter l'utilisation de ces termes.

#### 2.4.1.3.2 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<sup>140-143</sup>

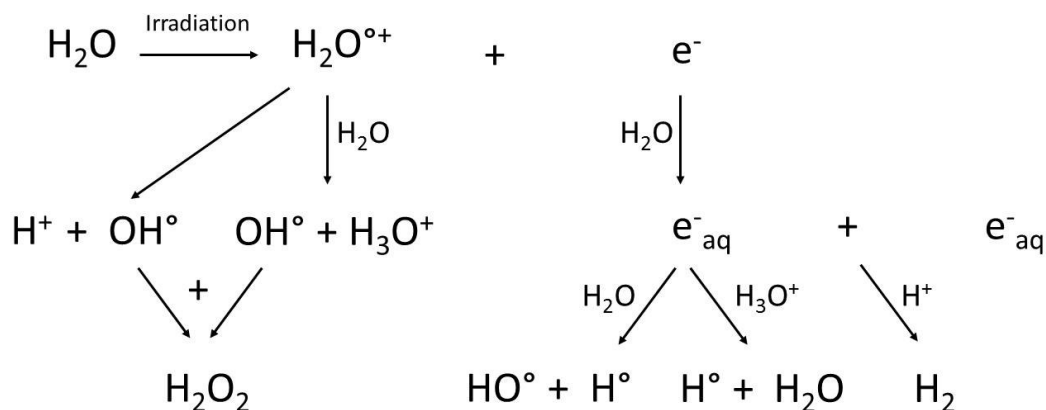


Elle aboutit rapidement à la formation de deux ions radicaux très instables qui donnent ensuite naissance à des radicaux neutres stables. L'ion  $\text{H}_2\text{O}^{+\bullet}$  dont la durée de vie est de  $10^{-10}\text{s}$ , subit une réaction ion-molécule bien connue en spectroscopie de masse :



La formation de l'ion ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) entraîne une acidification du milieu. Le radical  $\text{OH}^\circ$ , un oxydant très puissant, possède une grande réactivité chimique sur toutes les molécules avoisinantes (oxygène ou organique). Rappelons que le point « ° » signifie qu'un électron n'est pas 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 ( $\approx 6.6$  eV), les électrons primaires et secondaires produisent des électrons de *sous-excitation* jusqu'à ce qu'ils deviennent thermalisés ( $\approx 0.02$  eV). Les électrons thermalisés 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  $e^-_{aq}$ ,  $OH^\circ$ ,  $H^\circ$ , et de  $H_3O^+$  qui proviennent de la radiolyse<sup>140-143</sup>.



**Figure 10 :** Les différentes étapes de la radiolyse de l'eau.

#### 2.4.1.4 Les différents dommages radioinduits de l'ADN







##### 2.4.1.4.1 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  $\mu\text{m}$  de diamètre contient 3 mètres d'ADN. Environ cinquante milliards de kilomètres d'ADN se trouvent ainsi accumulés dans le noyau des quelques cinquante mille milliards de cellules d'un organisme humain.

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 (figure 11).

ADN nu double-hélice (nm)		Phase S
Nucléosome modèle solénoïdal (10 nm)		
Chapelet de nucléosome modèle « scoubidou » (30 nm)		
Boucles de chromatine (loops) (300 nm)		Phase G1
Spirale interphasique (700 nm)		Phase G2
Chromosome (1500 nm)		Phase M

**Figure 11** : 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 <sup>130</sup>.

#### 2.4.1.4.2 Dépôts d'énergie et sévérité des dommages

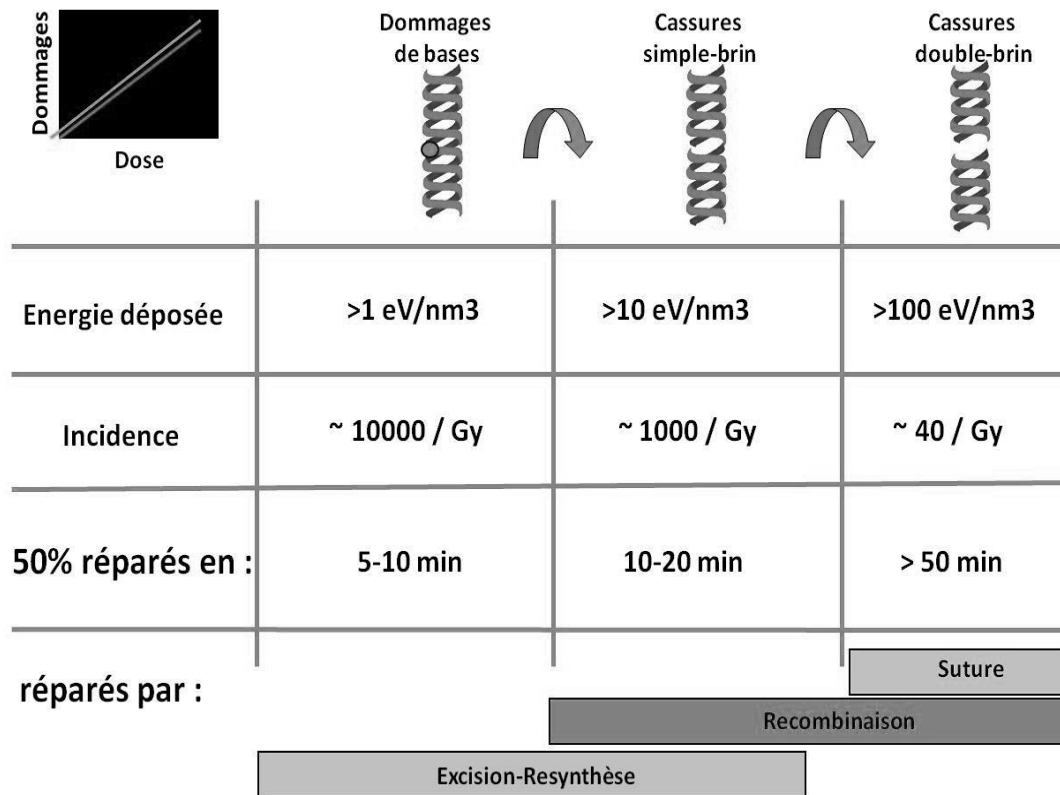
Lors de leur développement, les cellules font face à des dommages de l'ADN qu'elles créent elles-mêmes. C'est le cas notamment des cassures de l'ADN en phase S, des cassures chromosomiques lors de la mitose ainsi que de certaines cassures spécifiques lors de la production des immunoglobulines (recombinaison V(D)J)<sup>144</sup>. De plus, certains agents physiques ou chimiques, dits *génotoxiques* (UV, radiations ionisantes, drogues chimiothérapeutiques) sont à l'origine de plusieurs types de dommages de l'ADN (figure 12). 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<sup>145,146</sup>.



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<sup>147</sup> :

- 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*<sup>148</sup>.
- les CSB représentent environ 1000 dommages par Gy pour une irradiation X ou gamma<sup>149</sup>. Leur réparation est généralement exécutée en quelques dizaines de minutes par des processus d'*excision-resynthèse* et de recombinaison<sup>148</sup>.
- les CDB sont plus rares (environ 40 par Gy pour une irradiation X ou gamma<sup>149</sup> Les CDB non réparées peuvent conduire, dans certains cas, à la perte définitive de l'information génétique contenue dans la zone altérée<sup>150</sup>.

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 événements biochimiques radioinduits les plus fréquents : on estime à 1-10 eV.nm<sup>-3</sup> l'énergie nécessaire pour créer un DB et 10-100 eV.nm<sup>-3</sup> pour une CSB. Les pontages ADN-protéines (150 par Gy) et surtout les CDB (40 par Gy par cellule humaine diploïde) sont des événements beaucoup plus rares<sup>150</sup>. Pour créer une seule CDB, il faut plus de 100 eV.nm<sup>-3</sup>. Ainsi, la nature biochimique des lésions de l'ADN dépend directement de la densité d'énergie des microdépôts induits par les radiations<sup>151</sup>.



**Figure 12 :** Les différents types de dommages de l'ADN radioinduits et leurs caractéristiques physiques, biochimiques et biologiques<sup>130</sup>.

#### 2.4.1.4.3 Interaction entre les dommages de l'ADN

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 apparaît 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<sup>152</sup>.

## 2.4.2 Cassures de l'ADN et des chromosomes

### 2.4.2.1 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...<sup>153</sup>.
- chez les bactéries comme chez les levures, une CDB résiduelle est létale<sup>154</sup>. 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<sup>150</sup>.
- dans la période 1980-2000, une déficience de réparation des CDB a été observée pour plusieurs lignées cellulaires humaines. Ce fut le cas des lignées ATM<sup>-/-</sup><sup>155,156</sup>, de la lignée fibroblastique 180BR qui provient d'un patient leucémique radiosensible muté pour LIG4<sup>-/-</sup><sup>157</sup>, des lignées tumorales DNA-PK<sup>-/-</sup> M059J<sup>158</sup>, BRCA1<sup>-/-</sup> HCC1937 et BRCA2<sup>-/-</sup> Capan-1<sup>159</sup> : 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<sup>160</sup>: les syndromes génétiques liés à un défaut de réparation des CDB étant systématiquement associés à une radiosensibilité<sup>161</sup>.
- 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<sup>162</sup>.

### 2.4.2.2 Techniques de mesure des CDB

#### 2.4.2.2.1 Généralités sur les techniques de mesure de CDB

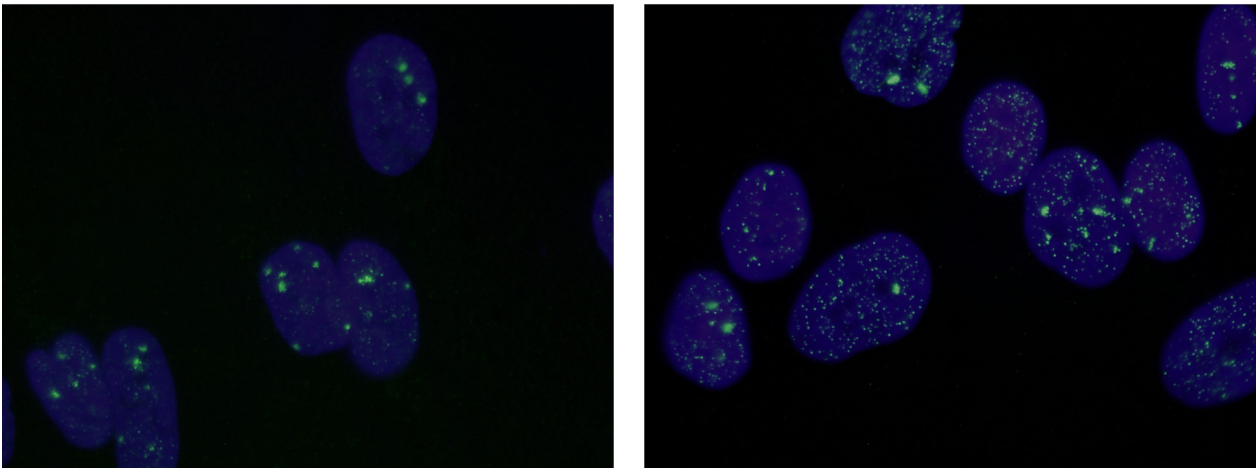
Comme pour tous les dommages radioinduits de l'ADN, la réponse aux radiations obéit à 3 phases pour les CDB<sup>163</sup>:

- *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'<sup>125</sup>I. En effet, chacune des cascades Auger produites donne une énergie suffisante pour former une seule CDB<sup>154,164,165</sup>. Toutefois, le point faible de la plupart de ces méthodes est le fait de nécessiter des doses importantes (plusieurs dizaines de Gy) pour obtenir un grand nombre de fragments pour pouvoir mesurer un signal, alors qu'il suffit de quelques Gy pour induire la létalité cellulaire<sup>166</sup>. La connaissance du lien entre la dose et l'effet devint alors cruciale.-

#### 2.4.2.2 Immunofluorescence

C'est la technique la plus utilisée actuellement. Elle est basée sur l'hybridation de sondes fluorescentes avec des anticorps dirigés contre des protéines d'intérêt. C'est notamment le cas pour les protéines impliquées dans la reconnaissance et la réparation des CDB, notamment pATM et  $\gamma$ H2AX qui se relocalisent de façon ponctuelle en formant des foci lumineux sur les sites de ces cassures (figure 9)<sup>167</sup>. 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 la difficulté du comptage des foci pour des doses élevées mais aussi aux artefacts de la fluorescence. De plus, des artefacts spécifiques ont été observés dans le cas de la co-immunofluorescence : quand deux couleurs sont utilisées, on observe souvent une superposition des foci qui suggère une co-localisation des protéines. Pourtant, une telle superposition est principalement causée par les chevauchements des spectres d'émissions et d'excitation des marqueurs de protéines utilisés. Cet artefact de co-immunofluorescence appelé en anglais *bleed-through* est à l'origine de nombreuses fausses interprétations<sup>168</sup>.



**Figure 13** : Exemple d'immunofluorescence avec marquage avec un anticorps anti- $\gamma$ H2AX. Chaque foci reflète un site de CDB (données du laboratoire).

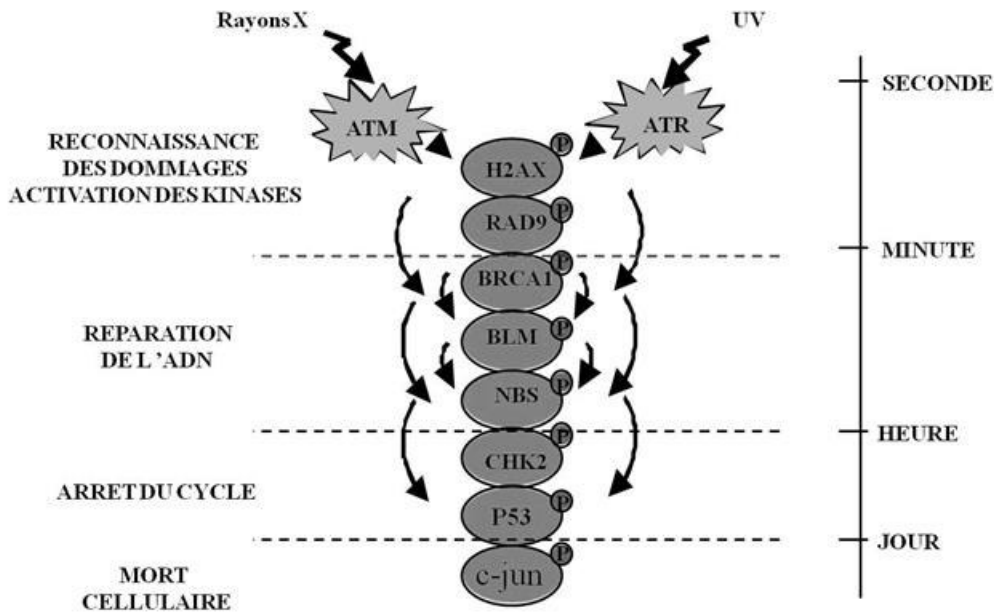
### **2.4.2.3 Induction des CDB**

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 ( $37 \pm 5$ ) CDB par Gy par fibroblaste diploïde humain quiescent et non-transformé<sup>156,160</sup>. 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<sup>169</sup>. 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.

### **2.4.2.4 Reconnaissance et signalisation des CDB**

L'oxydation qui crée 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<sup>170</sup>.

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<sup>170</sup> (figure 14).



**Figure 14 :** Hiérarchie des évènements après un stress génotoxique dépendant d'ATM ou d'ATR<sup>130</sup>

Deux kinases, ATM et ATR, jouent un rôle essentiel dans la reconnaissance et dans les phosphorylations radioinduites<sup>171,172</sup>. Ces kinases sont activées différemment : ATM réagit au stress oxydatif qui provoque l'induction des CDB, alors qu'ATR s'active en réponse à d'autres formes de dommages de l'ADN tels que ceux observés dans les fourches de réplifications bloquées<sup>172,173</sup>.

Lors de l'activation des sérine-thréonine kinases (comme DNA-PKcs, ATM ou ATR<sup>171,174</sup>), le résidu sérine 139 (motif SQE) de l'histone H2AX est phosphorylé<sup>175-177</sup>. 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 ( $\gamma$ H2AX), montre la présence de nombreux *foci* dans le noyau des cellules irradiées. Il existe une étroite corrélation entre le nombre de *foci*  $\gamma$ H2AX et le nombre de CDB induites après irradiation<sup>167,178</sup>. Une corrélation directe a été observée entre le nombre de *foci* et le nombre de CDB produites par la désintégration de <sup>125</sup>I incorporé dans l'ADN de cellules, démontrant que chaque *focus* représente une cassure et que chaque CDB forme un *focus*<sup>179</sup>.

Il est toutefois important de noter que la phosphorylation de H2AX est étroitement liée à la reconnaissance des CDB qui seront réparées par la suture et non la recombinaison : comme la suture est le mode de réparation très majoritaire chez les mammifères et les cellules quiescentes (état très majoritaire des cellules humaines), il est logique d'observer avec les foci  $\gamma$ H2AX la totalité des CDB induites par les radiations ionisantes. Pourtant, c'est en observant des exceptions à cette règle que nous avons pu mettre en évidence l'existence d'une sous-population d'individus radiosensibles, à l'origine de notre théorie générale.

#### **2.4.2.5 Réparation des CDB**

##### **2.4.2.5.1 « Le modèle de la chaussette »**

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

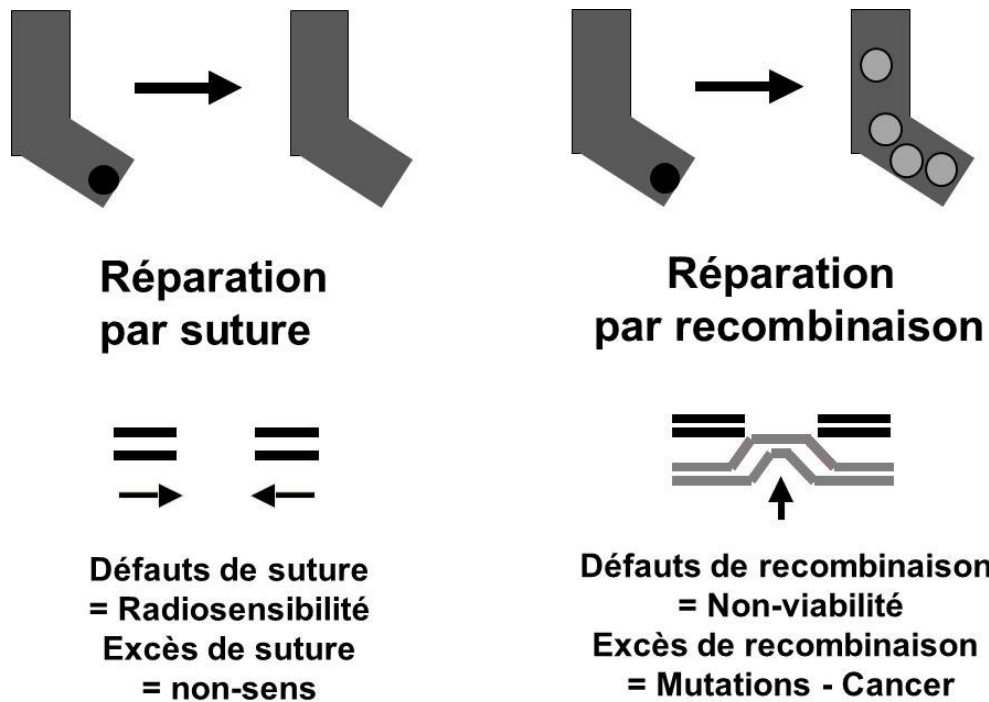
- la recombinaison, majoritaire au cours des phases S et G2 du cycle cellulaire,
- la suture ou (*NHEJ : non-homologous end-joining*) qui est prédominante pendant la phase G1.

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 » aux vertus didactiques (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 lier ; et le rapiéçage (ou recombinaison) qui consiste à insérer un brin coupé dans le trou formé par la première cassure. Ce mode de réparation produit donc 2 autres cassures. C'est donc un mode de réparation qui casse* ». 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 15).



#### 2.4.2.5.2 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*)<sup>180</sup>. Dans le cas inverse (non-homologue), on parle alors de recombinaison illégitime ou *non-homologue*<sup>181</sup>. 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<sup>182</sup>.



**Figure 15 :** 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 rapiécage-recombinaison s'accompagne souvent de l'induction d'autres cassures elles-mêmes subissant la recombinaison (phénomène d'hyper-recombinaison)<sup>130</sup>.

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<sup>183,184</sup>. 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<sup>172</sup>.

### 2.4.2.5.3 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<sup>185</sup>, 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 13). 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<sup>186</sup>. 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<sup>163,169</sup>.

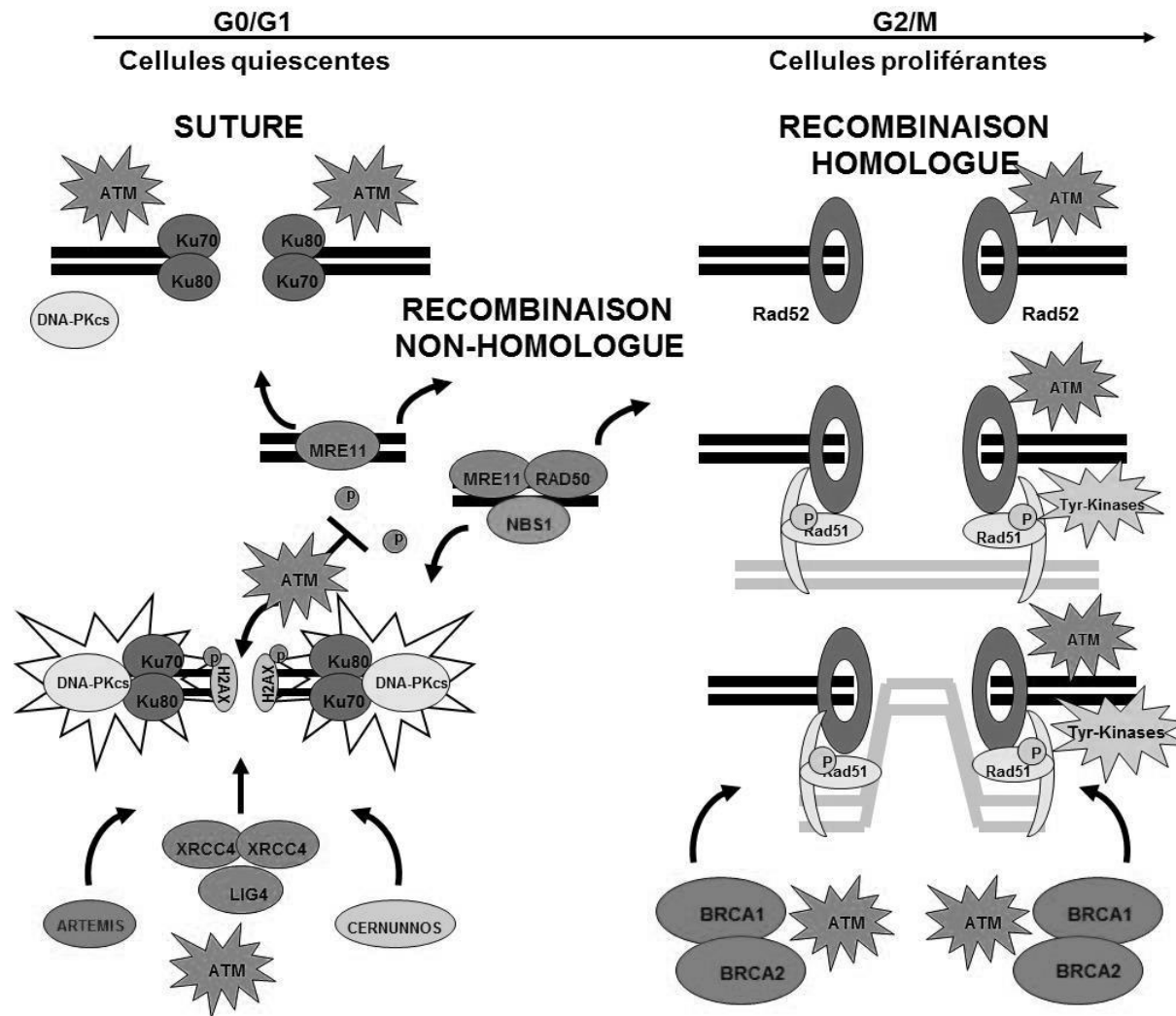


Figure 16 : Principales voies de réparation des CDB<sup>130</sup>

#### 2.4.2.5.4 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<sup>169,187</sup>.

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. Notre modèle a intégré cette remarque importante<sup>169,187</sup>.

## **2.4.2.6 Rôle de ATM dans la réponse aux dommages**

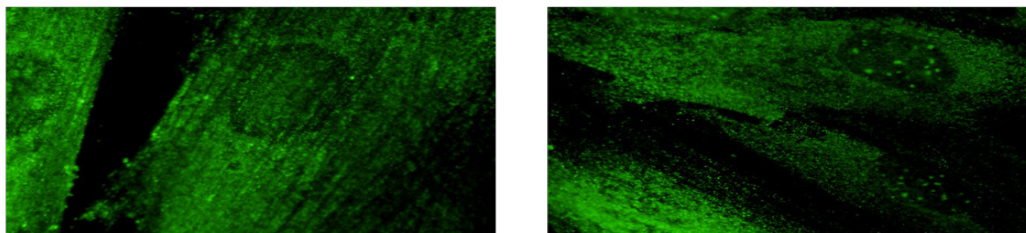
### **2.4.2.6.1 Généralités sur ATM**

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<sup>188</sup>. 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<sup>189</sup>. 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<sup>190</sup>. Le complexe MNR augmenterait ainsi l'activité kinase d'ATM « par feed-back »<sup>191</sup>. 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. Nous nous proposons donc dans cette thèse de ne retenir que les conclusions dépourvues, dans la mesure du possible, de tout artéfact technique ou de condition expérimentale qui ne corresponde pas à la réalité clinique.

### **2.4.2.6.2 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<sup>192,193</sup>. 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 (voir §8). 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<sup>194,195</sup>. 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<sup>196</sup>, l'insulino-résistance<sup>197</sup>, la modification du cytosquelette<sup>198</sup>, le déficit de l'immunité humorale<sup>199</sup>, les modifications de la régulation des canaux K<sup>+</sup><sup>200</sup>. 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<sup>201</sup>. 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.



**Figure 17 :** Exemples d'images d'immunofluorescence avec un anticorps anti-pATM sur des fibroblastes cutanés non-irradiés (à gauche) et dix minutes après irradiation (à droite). On observe notamment une partie importante de marquage cytoplasmique puis une relocalisation sous forme de foci après exposition (Données du laboratoire).

## 2.4.3 La survie cellulaire

### 2.4.3.1 La mort radiobiologique

A la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, la plupart des types de mort cellulaire était connu, grâce aux pionniers, qui patiemment décrivent avec force détails ce qu'ils observaient au microscope<sup>202,203</sup>. 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. Cette définition a des conséquences insoupçonnées :

- 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<sup>169</sup>. Par exemple, après des doses 4 à 20 fois supérieures à la dose létale moyenne, les cellules sont mortes (stérilisées) mais réparent<sup>204</sup>. En effet, la notion de mort est définie à *l'échelle de la cellule*, alors que la réparation, qui peut s'effectuer dans un tube à essai contenant, eau, sels, protéines et ADN, est *une notion moléculaire* (la mort « moléculaire » refléterait ici la destruction des protéines et de l'ADN).
- cette définition convient bien à la radiothérapie anti-cancéreuse qui tente de stopper définitivement la prolifération de la tumeur, sans pour autant exiger une disparition physique immédiate. En effet, une tumeur, contrainte dans son volume pendant un certain temps, peut montrer des signes de destruction et disparaître. A l'inverse, des cellules mortes peuvent poursuivre quelques cycles cellulaires et stopper ensuite définitivement leur croissance :
- c'est le cas des *clones abortifs* qui montrent l'aspect de petites colonies. Il a fallu définir la notion de « colonie ». Par convention, on considère qu'une

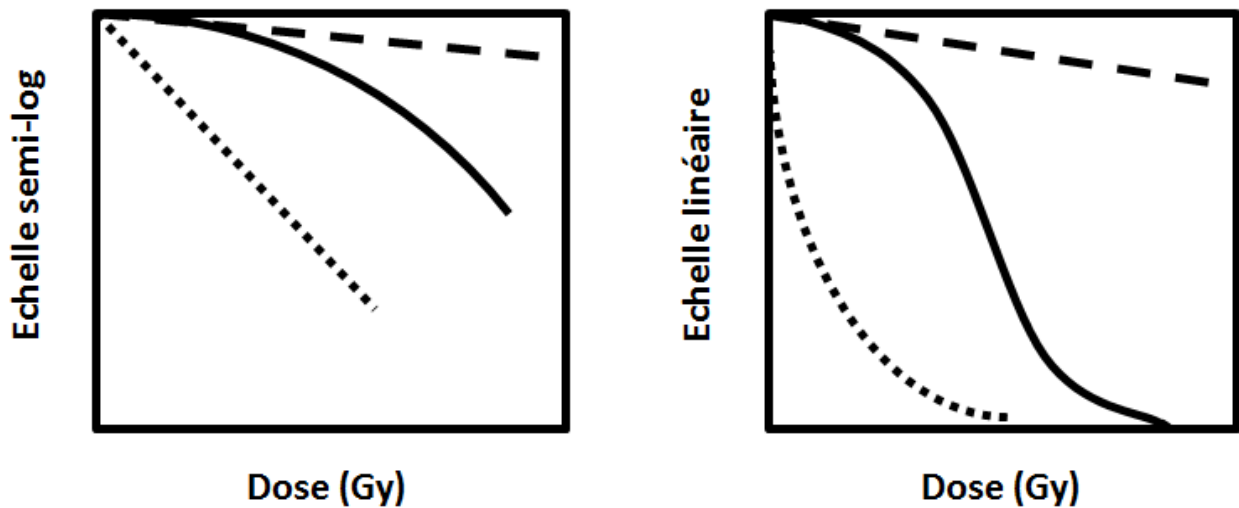


colonie est le résultat d'au moins 50 cellules filles, c'est-à-dire qu'elle a été produite par au moins 5 doublings ( $2^5 = 32$  ;  $2^6 = 64$ )<sup>141</sup>.

### 2.4.3.2 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 un nombre connu de cellules puis à en quantifier les colonies issues des cellules filles (en respectant la définition des colonies expliquée plus haut)<sup>205</sup>. 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 18).

### Fraction cellulaire survivante



**Figure 18 :** 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.

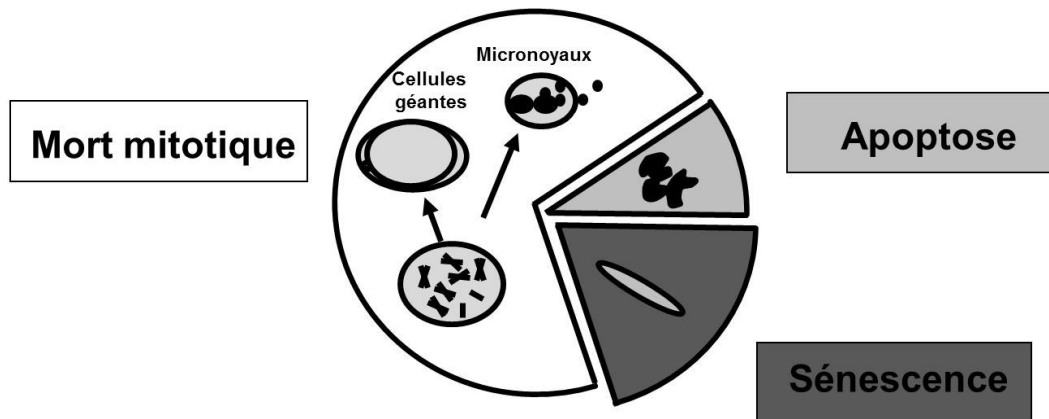
### 2.4.3.3 Les trois types de morts de cellulaire

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, l'*intercinèse*, qui décrit la disparition physique quasi-immédiate de la cellule après des doses de radiations de plusieurs milliers de Gy, doses à partir desquelles l'effet thermique des radiations devient dominant. D'autres termes de mort cellulaire (comme 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<sup>206</sup> ainsi que l'ontose<sup>207</sup> 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 et 133 (figure 19).

**L'apoptose :** L'*apoptose* est une mort dite *programmée* déclenchée par une CDB non réparée<sup>208</sup>. Elle se traduit par une libération d'endonucléases qui digèrent massivement l'ADN<sup>209,210</sup>. L'apoptose requiert généralement une protéine p53 fonctionnelle<sup>211</sup>. Contrairement à la mort mitotique, l'apoptose se produit le plus souvent *en interphase* (G1,G2) (figure 19).

**La sénescence** : Plus récemment encore, *l'arrêt irréversible en G1* a été décrit lui aussi comme une cause de mort radiobiologique<sup>212</sup>. L'arrêt irréversible en G1 est également associé à une CDB non réparée et dépend de p53 mais surtout de p21<sup>213</sup>. 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 19).



**Figure 19 :** 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.

## 2.4.4 L'approche générale du laboratoire d'accueil.

### 2.4.4.1 Justification des choix techniques

#### 2.4.4.1.1 Choix des tests fonctionnels de la réparation des CDB

Depuis les années 90, trois grandes approches ont été adoptées pour déterminer les bases moléculaires de la radiosensibilité<sup>166</sup> :

- L'approche génomique, qui consiste à déterminer, par la connaissance des *séquences des gènes*, certaines mutations qui seraient la cause de la radiosensibilité. C'est le cas de la recherche des polymorphismes nucléotidiques simples (SNP).
- L'approche protéomique, qui consiste à déterminer, par la connaissance de *l'expression des gènes*, des protéines dont la régulation conditionnerait la réponse aux radiations
- 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.

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<sup>214,215</sup>. A l'origine établie pour les CDB radioinduites, une telle conclusion semble être valable aussi pour tous les agents cassants de l'ADN. Dès lors, **une évaluation du risque toxique et cancérigène basée sur la quantification des CDB et des fonctionnalités de leur voie de réparation apparaît donc comme logique**. Outre les conclusions de la littérature, ces constats se basent sur trois constats essentiels :

- La très grande majorité des syndromes associés à une radiosensibilité significative sont causés par la mutation de de protéines impliquées dans la réparation et la signalisation des CDB
- Les CDB sont à l'origine des cassures chromosomiques, événement cytogénétique dont l'implication dans la létalité ou la transformation cellulaire fait consensus<sup>216</sup>.
- 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<sup>153</sup>.

En dépit de ces arguments, la popularité des expériences de génomique ou de protéomique (notamment expliquée par leur rapidité et leur simplicité) a occulté l'intérêt des tests fonctionnels concernant les CDB dans la détection de la radiosensibilité. D'ailleurs, ces derniers devenaient de moins en moins accessibles car leur mise en place fait souvent appel à un « savoir-faire » technique important. En parallèle, en ne suivant toujours aucune logique les tests apoptotiques à partir de lymphocytes devenaient également populaires en dépit d'artéfacts techniques qui ne se révélèrent que très récemment<sup>166,215,217</sup>. L'approche du laboratoire, délibérément basée sur des tests fonctionnels de la réparation et de la signalisation des CDB ne pouvait apparaître que comme une démarche à contre-courant.

#### 2.4.4.1.2 Choix des modèles cellulaires

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

- L'homologie *de séquence* et encore moins l'homologie *fonctionnelle* des gènes des espèces animales sont loin d'être vérifiée avec les gènes humains correspondants. D'ailleurs, l'homologie des gènes entre espèces est généralement basée sur une simple affirmation d'un groupe d'auteurs sur l'existence de certains domaines en commun voire identique. L'exemple représentatif est le gène *brca1* du rongeur qui n'a que 58% d'identité avec le gène humain BRCA1. La mutation de *brca1* chez le rongeur ne conduit à aucune prédisposition au cancer du sein alors que chez l'homme, les mutations hétérozygotes BRCA1+/- augmentent d'un facteur 6 à 10 le risque de cancer du sein<sup>166,218</sup>.
- La taille du noyau des modèles animaux est généralement inférieure à la taille d'un noyau humain. Par voie de conséquence, la cible étant plus petite, les animaux sont plus radiorésistants que l'homme (ex : la dose létale moyenne est de 15 Gy chez le rat alors qu'elle est de 4,5 Gy chez l'homme). Ainsi, toutes les courbes effet-dose et les valeurs de seuil sont différentes suivant les espèces et le passage de l'une à l'autre ne suit pas une loi forcément linéaire.

Ainsi, en dépit des difficultés pratiques de culture cellulaire, le laboratoire d'accueil a délibérément choisi de n'utiliser que des cellules humaines non-transformées. Par contre, le choix pouvait se porter sur les lymphocytes ou les fibroblastes de peau. Là encore, l'argumentation devait 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.

- 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 peut ne pas être représentatif de la réponse aux radiations, avec en plus, le risque d'artéfact technique potentiel dû à la production de CDB au cours du processus apoptotique et non immédiatement après l'irradiation.
- 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, non pas la même radiosensibilité que des fibroblastes.

Là encore, cette démarche qui a beaucoup de contraintes, est à contre-courant de la pratique d'autres laboratoires qui favorisent l'utilisation de lignées qui poussent très rapidement mais sans s'assurer des artéfacts causés par les facteurs évoqués ici<sup>166</sup>.

## 2.4.5 La radiosensibilité individuelle

### 2.4.5.1 Radiosensibilité : histoire d'un mot

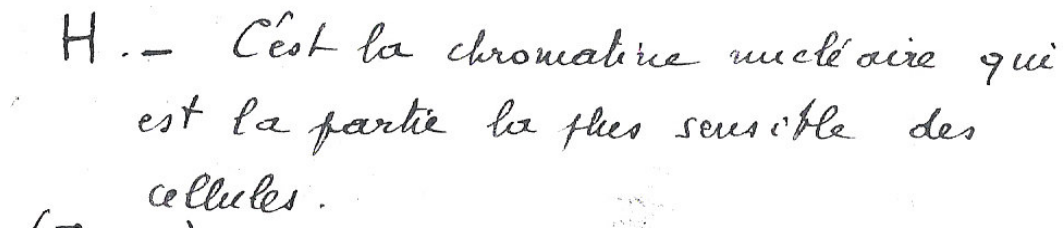
A l'exception de Victor Despeignes en juillet 1896 et de quelques tentatives isolées de radiothérapie <sup>219</sup>, les rayons X furent surtout utilisés au début du XXème siècle pour la radiographie voire pour la radio-épilation<sup>220,221</sup>. C'est probablement surtout cette dernière approche 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<sup>29,222</sup>. Toutefois, l'origine du mot « radiosensibilité » remonte probablement à la naissance du terme « radioactivité » inventé par les Curie. Il faut en effet rappeler certaines études pionnières :

- la communication de 1901 où Pierre Curie relate l'expérience qu'il a faite sur lui-même avec une fiole contenant du baryum radifère déposée sur son avant-bras<sup>223</sup>;
- les travaux de Louis Tribondeau et Jean Bergonié à Bordeaux en 1906<sup>224</sup> qui aboutissent à la loi dite de Tribondeau et Bergonié qui s'avéra fautive<sup>225</sup>;
- les travaux que mena Claudius Regaud à Lyon de 1906 à 1911 et qui jetèrent les premières bases de la radiobiologie<sup>203</sup>. En 1908, Regaud écrit « *C'est la chromatine nucléaire qui est la partie la plus sensible des cellules* » (figure 20).

Ainsi, 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 décennie 1900-1910. Dans le corpus de la Bibliothèque Nationale de France, la première occurrence de « radiosensibilité » est observée paradoxalement en mars 1910 sur la traduction d'une communication du médecin allemand Joseph Wetterer sur la radiothérapie des néoplasmes sous-cutanés, communication présentée lors du Congrès International de Physiologie à Paris<sup>226</sup>. Il a été difficile aussi de trouver des études contenant le terme « Strahlenempfindlichkeit », traduction allemande du terme « radiosensibilité » dans cette même période. En fait, ces occurrences, qu'elles soient françaises ou allemandes apparaissent dans des citations, sans doute apocryphes, des



communications de la décennie 1900-1910 mais datant des années 1920-30 et donc ne peuvent constituer une preuve d'usage de cette époque pionnière.



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

**Figure 20 :** Notes manuscrites de Claudius Regaud (Archives Fonds Regaud de l'Institut Curie)

#### 2.4.5.2 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 cette thèse 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 »<sup>121</sup>. 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<sup>161</sup>.

#### 2.4.5.3 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<sup>222,227,228</sup>. 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<sup>229</sup>, notamment grâce aux travaux de Jean Bergonié, véritable moteur des « électro-radiologistes »<sup>230,231</sup>. 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.* »<sup>229</sup>. 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<sup>232</sup>. 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<sup>220,221</sup>. 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<sup>220</sup> (figure 21). 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<sup>203</sup> : 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<sup>157,233-235</sup>. Plus récemment, en 2010, un patient hyper-radiosensible succomba après radiothérapie sans pour autant montrer des signes évidents d'une ataxie-télangiectasie<sup>236</sup>. L'accident de sur-irradiation d'Epinal<sup>237,238</sup>

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.

---

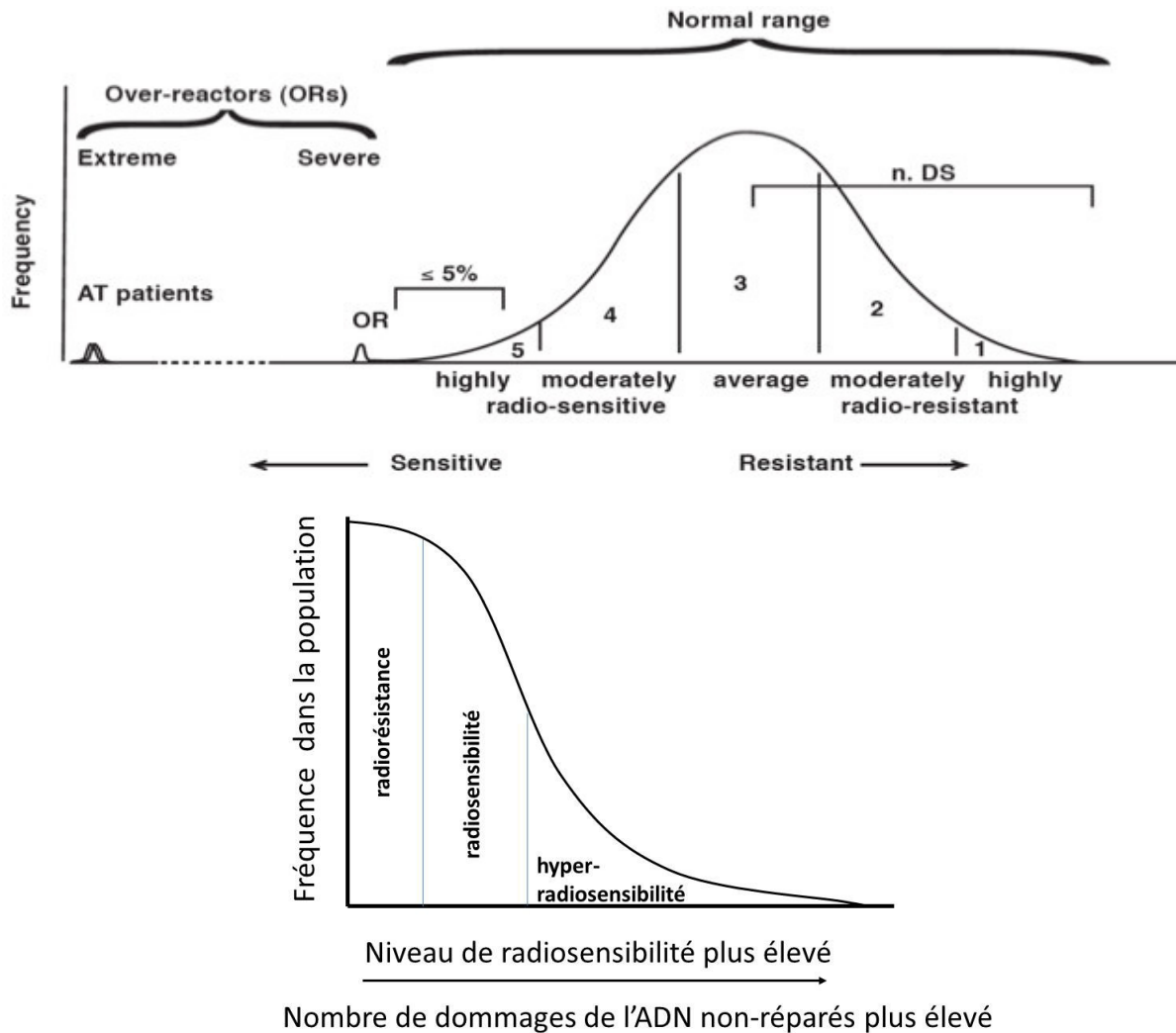
**SUR LA DIFFÉRENCE DE SENSIBILITÉ AUX RAYONS DE RÖNTGEN DE LA PEAU  
DES DIFFÉRENTS SUJETS, ET, SUR LE MÊME SUJET, DES DIFFÉRENTES  
RÉGIONS DU CORPS.  
QUE DOIT-ON PENSER DU TRAITEMENT RADIOTHÉRAPIQUE  
DE L'HYPERTRICHOSE ET DE L'HYPERHIDROSE ?**

**Figure 21** : *En-tête de la communication de Léon Bouchacourt sur la radiosensibilité individuelle (Congrès AFAS, Dijon, 1911)*<sup>220</sup>.

#### **2.4.5.4 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<sup>239</sup> (figure 22). D'ailleurs la représentation de la figure 22 implique qu'il existe des individus hyper-radorésistants 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 (radorésistance 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<sup>222</sup>. 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 29B 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<sup>29</sup> et suggérerait l'existence d'une sous-population à la radiosensibilité significative mais modérée dont l'importance serait non négligeable.



**Figure 22 :** A. Répartition de la radiosensibilité individuelle au sein de la population générale d'après<sup>239</sup>. 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<sup>240</sup>.

#### 2.4.5.5 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 dermatites 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<sup>240</sup>. 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 à 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.

D'après l'Institut de Radioprotection et Sûreté Nucléaire (IRSN), une exposition est dite accidentelle s'il existe une différence importante et non-négligeable avec la prescription originale. On définit 5 types d'accidents : a) Erreur sur le patient ; b) Erreur sur le site anatomique irradié ; c) Différence substantielle par rapport à la dose prescrite à la tumeur ; d) Mauvaise distribution de la dose ; e) Mauvais fractionnement de la dose. 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<sup>241</sup>. 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<sup>241</sup>. En France, 5 accidents

de radiothérapie ont été recensés : Grenoble (2003), Lyon et Tours (2004), Epinal (2004 et 2005)<sup>237</sup> 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 Sûreté 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)<sup>242</sup>. 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<sup>237</sup>. Ainsi, en dépit d'un excès de dose physique constaté, des variations inter-individuelles sont systématiquement observables avec une dispersion quasiment gaussienne des grades de sévérité. Ainsi, les réactions tissulaires observées sur les patients les plus radiosensibles pourraient 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. Cela montre également que les radiothérapeutes, les radiophysiciens et les radiobiologistes doivent travailler ensemble afin de mieux évaluer doses physiques et biologiques.

#### **2.4.5.6 Réparatoses et syndromes radiosensibles**

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)<sup>161</sup>.

##### **2.4.5.6.1 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. L'ataxie télangiectasie (AT), le syndrome associé à la plus forte radiosensibilité connue chez l'homme est causé

par la mutation homozygote d'ATM (Tableau 2). Cette maladie a été décrite pour la première fois en 1926 par Syllaba et Hennen<sup>243</sup>, puis ensuite par Madame Louis-Bar en 1941<sup>244</sup>. Son taux d'incidence est estimé à environ 1/100000 aux Etats-Unis et en Grande Bretagne<sup>245</sup>. Les symptômes associés sont : ataxie cérébelleuse sévère avec une espérance de vie dépassant rarement les 30 ans<sup>246</sup>, des télangiectasies oculocutanées<sup>247</sup>, une synthèse déficiente des immunoglobulines IgA, IgE et IgG2, une forte prédisposition aux cancers (leucémies et lymphomes) et un remaniement spontané des chromosomes<sup>248</sup>. Comme on l'a dit, les patients AT souffrent aussi d'une hyper-radiosensibilité<sup>249</sup>. Les autres caractéristiques radiobiologiques associées à l'AT sont de nombreuses aberrations chromosomiques<sup>246</sup>, l'absence de contrôle du cycle en G1 et d'inhibition de la synthèse de l'ADN (appelée improprement *synthèse radiorésistante*)<sup>250,251</sup>. 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<sup>252</sup> mais avec une radiosensibilité peu marquée<sup>159</sup>. La kinase ATR, serait plus impliquée dans la réponse aux dommages de bases qu'aux CDB et aux UV plutôt qu'aux radiations ionisantes<sup>170</sup>. 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<sup>253</sup>.



## **2.4.5.6.2 Maladies de la réparation par suture**

### **2.4.5.6.2.1 Mutations de Ku et DNA-PKcs**

Chez l'homme, à l'exception de 2 lignées cellulaires<sup>158,254–256</sup>, 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 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  $\gamma$ H2AX est très faible dès les premières minutes après irradiation alors qu'il est maximal dans les lignées mutées pour DNA-PKcs<sup>160</sup>. 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<sup>161</sup>.

### **2.4.5.6.2.2 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<sup>257,258</sup>. En 2001, un syndrome humain associé à des mutations de la ligase IV a été identifié par O'Driscoll *et al.*<sup>157,259</sup>. Ce syndrome est caractérisé par une radiosensibilité et une immunodéficiences très marquées, une forte pancytopenie, 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 radiochimiothérapie<sup>157,259</sup>.

### **2.4.5.6.2.3 Mutations de Artémis, Cernunos 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 immunodéficiences 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<sup>260</sup>. Artémis est une nucléase qui serait indispensable pour le clivage de séquence en épingle à cheveux mais pas pour la phase essentielle de ligation<sup>261</sup>.

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<sup>262,263</sup>. 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<sup>262,263</sup>.

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<sup>264,265</sup>.

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<sup>161</sup>.

#### **2.4.5.6.3 Maladies de la recombinaison non-homologue**

##### **2.4.5.6.3.1 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<sup>266</sup>. Les cellules NBS<sup>-/-</sup> sont

caractérisées par une instabilité chromosomique<sup>267-269</sup>. Elles sont hypersensibles aux radiations ionisantes et présentent une absence d'arrêt du cycle en G1<sup>267</sup>.

#### **2.4.5.6.3.2 Mutations de MRE11**

Des mutations de MRE11 ont déjà été identifiées chez trois patients<sup>160,270</sup>. 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)<sup>270</sup>. ATLD est un syndrome d'ordre neurologique avec une radiosensibilité comparable au syndrome de Nimègue mais sans être associée à une immunodéficiences et une prédisposition au cancer<sup>271,272</sup>.

#### **2.4.5.6.3.3 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<sup>266,273</sup>. La patiente a développé un lymphome malin à l'âge de 23 ans sans présenter d'immunodéficiences sévères. 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)<sup>266</sup>.

#### **2.4.5.6.4 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<sup>274,275</sup>. 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 8). 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<sup>275</sup>. 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<sup>275</sup>. 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<sup>275</sup>.

#### **2.4.5.6.5 Maladies des protéines-supports**

##### **2.4.5.6.5.1 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<sup>276-278</sup>.

Comme pour BRCA1, les mutations nullizygotiques de BRCA2 n'existent pas chez l'homme<sup>279,280</sup>. Les mutations hétérozygotes de BRCA2 rendent compte de la majorité

des cancers familiaux de l'ovaire et du sein maternel. BRCA1 et BRCA2 seraient indispensables à l'action de Rad51 et Rad52 dans la recombinaison homologue active en G2/M<sup>169</sup>.

#### **2.4.5.6.5.2 Mutations des gènes FANC**

L'anémie de Fanconi (FA) fait partie des syndromes héréditaires d'insuffisance médullaire. 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<sup>281</sup>. 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<sup>160,281</sup>. Notons que les protéines BRCA2 et FANCD1 sont identiques<sup>282</sup>.

#### **2.4.5.6.6 Les autres syndromes liés à une radiosensibilité**

On peut aussi ajouter à la liste des syndromes évoqués ci-dessus (Tableau 8) 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)<sup>283</sup>, la trichothiodystrophie (TTD) et le syndrome de Cockayne (CS) qui sont des réparatoses des nucléotides par excision-resynthèse (*nucleotide excision resynthesis* [NER])<sup>284,285</sup> et des cancers du côlon héréditaires non polyposiques (*hereditary non-polyposis colon cancer* [HNPCC])<sup>286</sup> qui sont des réparatoses concernant les mésappariements de l'ADN (*mismatch repair* [MMR])<sup>287</sup>. 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.

#### **2.4.5.6.7 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<sup>288,289</sup> (Tableau 8). 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.

#### **2.4.5.6.8 Syndromes radiosensibles et risque de cancer**

Afin de comparer quantitativement radiosensibilité et risque de cancer, un paramètre commun peut être l'incidence ou la prévalence des syndromes. Ainsi, la figure 23 montre que plus la radiosensibilité augmente, plus le syndrome est associé à un haut risque de cancer et plus il est rare. Cette représentation permet d'évaluer l'incidence des groupes de radiosensibilité définis dans les prochains chapitres (figure 23).

Syndromes génétiques	Gène muté	SF2 (%)
Ataxie telangiectasie (homoz. classiques)	ATM	1-5
Syndrome Ligase IV	LIG4	2-6
Syndrome de Nimègue	NBS1	5-9
<i>Progeria (Hutchinson-Gilford)</i>	<i>Lamin A</i>	8-19
Ataxie telangiectasie (homoz. variants)	ATM	10-15
<i>Syndrome d'Usher</i>	<i>Gènes USH</i>	15-20
Syndrome de Cockayne	Gènes CS	15-30
Xeroderma Pigmentosum	Gènes XP	15-30
Syndrome ATLD	MRE11	15-40
<i>Chorée de Huntington</i>	<i>IT15</i>	18-30
<i>Neurofibromatose type I</i>	<i>NF1</i>	18-30
<i>Syndrome de Gardner</i>	<i>APC ?</i>	20-30
<i>Syndrome de Turcot</i>	<i>hMSH2 ?</i>	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).

**Tableau 8 :** Principaux syndromes génétiques associés à une radiosensibilité

RÉACTIONS  
TISSULAIRES

## Radiosensibilité et radiosusceptibilité

CANCER

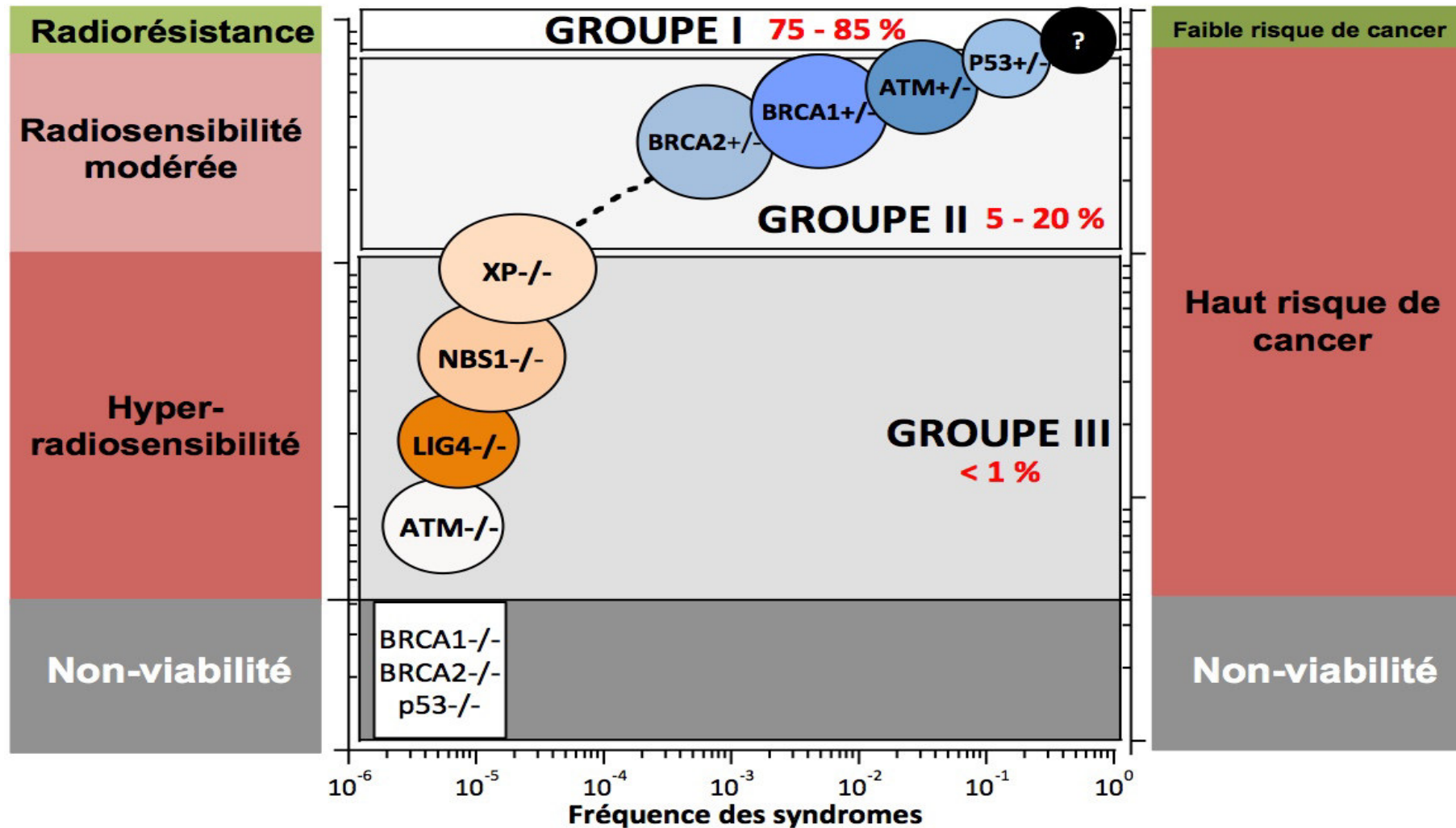


Figure 23 : Principaux syndromes génétiques associés à une radiosensibilité et/ou une prédisposition au cancer en fonction de leur fréquence.



## 2.4.6 Les acquis du laboratoire d'accueil depuis 2003

### 2.4.6.1 Une première corrélation quantitative entre radiotoxicité et CDB non réparées.

En 2003, des techniques d'immunofluorescence avec un biomarqueur appelé H2AX permet de détecter chaque CDB dans chaque noyau de cellules<sup>290</sup>. Toutefois, à l'époque, aucun élément ne permettait de déterminer si les foci pH2AX reflétaient toutes les CDB ou au contraire, les CDB reconnues par la suture. Une dose de 1 Gy de rayons X produisant environ 40 CDB par cellule, cette technique permit aux radiobiologistes de mesurer des effets de l'ordre du mGy (mSv pour des rayons X). L'analyse des effets biologiques de doses de radiation compatibles avec certaines expositions professionnelles ou médicales devint alors possible. Depuis 1995 et la thèse de Nicolas Foray puis à partir de 2003, le laboratoire d'accueil créé sur au synchrotron européen de Grenoble commença à rassembler ce qui est aujourd'hui l'une des plus grandes collections de fibroblastes humains provenant de syndromes génétiques associés à une radiosensibilité significative : la collection COPERNIC (Collection pour l'étude de la radiosensibilité au niveau clinique). A travers le projet sur fonds propres CELLINE, le laboratoire d'accueil entreprit d'étudier l'induction et le rythme de réparation des CDB en utilisant plusieurs techniques comme l'électrophorèse en champs pulsés et l'immunofluorescence pH2AX. En plus du marqueur H2AX, d'autres furent utilisés, notamment pDNA-PK et MRE11 pour mesurer respectivement l'activité kinase DNA-PK impliquée dans la suture et l'activité endonucléase 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 artefacts techniques observés en co-immunofluorescence<sup>291</sup>.

En 2008, à partir de 40 lignées fibroblastiques représentant 8 syndromes génétiques différents, La valeur de la survie clonogénique à 2 Gy (SF2) (dose d'une session de radiothérapie classique) apparut comme inversement proportionnelle au taux de CDB non réparées à 24 h, quelle que soit la mutation du gène considéré ou la technique utilisée. Cette loi semble également valable pour toutes les cellules de mammifères<sup>160</sup>. A la suite de ces résultats, le laboratoire d'accueil a proposé une première classification en 3 groupes sur la base des valeurs de SF2, du taux de CDB non réparées après une dose de 2 Gy quantifiée par le nombre de foci pH2AX et du taux de foci MRE11: groupe I, radiorésistance ; groupe II, radiosensibilité modérée ; groupe III : hyper-radiosensibilité<sup>160</sup>.

#### 2.4.6.2 La genèse du modèle du transit cyto-nucléaire d'ATM

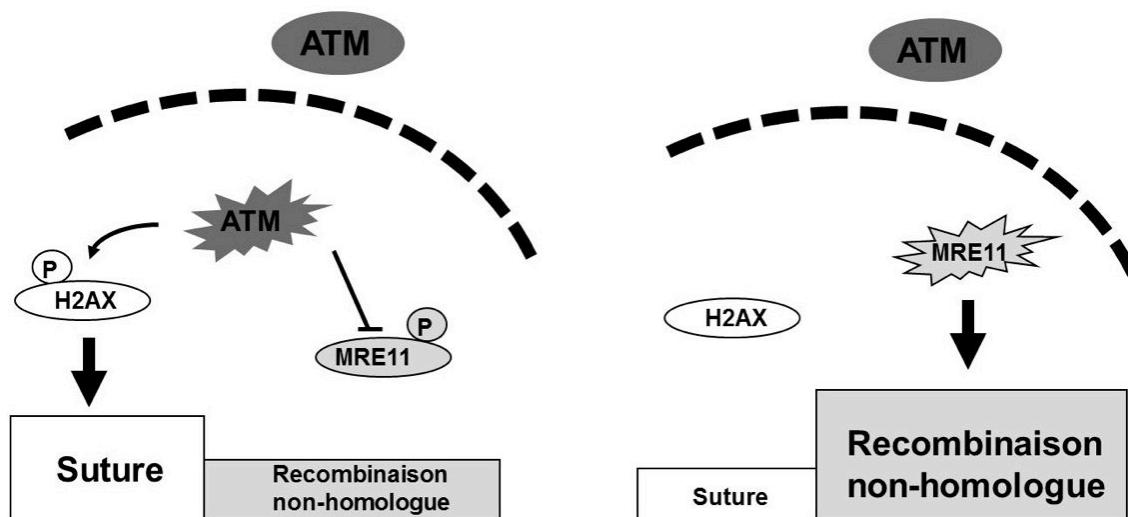
En parallèle du projet CELLINE qui se poursuit encore au laboratoire d'accueil, deux démarches furent entreprises :

- L'accumulation de données systématiques sur toutes les protéines qui forment des foci nucléaires, en particulier de pATM, marqueurs de l'auto(trans)phosphorylation de la protéine pATM
- Le début d'une collecte de fibroblastes issus de patients traités par radiothérapie et ayant montré une radiosensibilité clinique significative sous la forme de réaction tissulaire. Ce projet sur fonds propres 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 350 aujourd'hui), les premières conclusions sont les suivantes :

- Plus que les foci pDNA-PK, les foci pATM sont très informatifs et suggèrent un transit cyto-nucléaire de la protéine après irradiation. Cette hypothèse est notamment renforcée par l'effet du traitement statines+biphosphonates qui semble accélérer le transit d'ATM<sup>275,292</sup>.
- Les critères de sélection pour les groupes I, II et III définis précédemment apparaissent comme valables pour les cellules des patients de la cohorte COPERNIC.

Ainsi, nous avons pu proposer un modèle impliquant ATM pour mieux traduire l'importance de son transit. Dans notre modèle, les CDB sont prises en charge par le mode majoritaire de réparation par suture » dont l'initiation passe par la phosphorylation ATM-dépendante de l'histone H2AX (pH2AX). En cas de retard du transit, les CDB sont soit non-reconnues donc non-réparées par suture soit pourraient être prise en charge et par le mode minoritaire de réparation fautive de type recombinatoire dépendant de la nucléase MRE11 et inhibée par le passage de ATM dans le noyau. L'équilibre entre ces deux modes est donc contrôlé par la protéine ATM à travers son transit du cytoplasme dans le noyau et son activité kinase. Les foci nucléaires MRE11 indiqueraient alors un arrêt de l'activité nucléasique de MRE11<sup>160,169,217</sup> (figure 24).



**Figure 24 :** Notre modèle pATM/MRE11/  $\gamma$ H2AX 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.

#### 2.4.6.3 Les principes généraux du modèle du transit cyto-nucléaire d'ATM

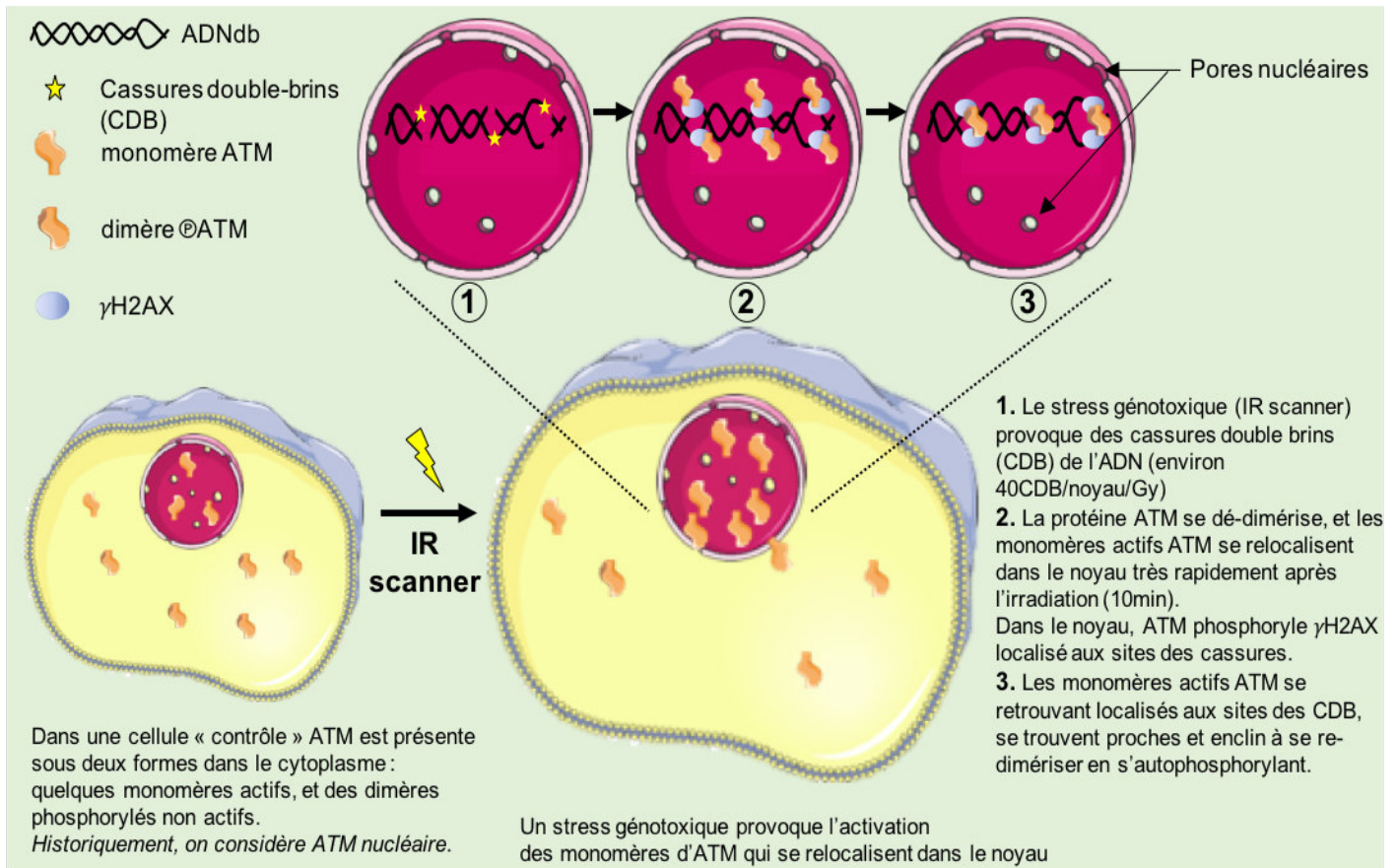
En 2016, l'analyse des 100 premières lignées fibroblastiques de la collection COPERNIC a permis de montrer avec une très haute performance statistique que le nombre de foci nucléaires pATM après 2 Gy suivis de 10 min ou de 1 h post-irradiation est inversement proportionnel au grade de sévérité des réactions tissulaires quantifié par l'échelle consensuelle CTCAE. Ce résultat est à la base de tests de radiosensibilité qui sont aujourd'hui régis par 7 brevets. La faisabilité de l'application de ce test a également fait l'objet d'une publication quelques mois plus tard<sup>293</sup>. Enfin, en 2018, une variante du test de prédiction basé cette fois sur une approche ELISA (quantifiant les molécules pATM par hybridation) plutôt que par immunofluorescence (quantifiant les foci nucléaires pATM) a été proposée<sup>294</sup>. Toutefois, même si cette variante est plus rapide que le test initial, ses performances statistiques sont plus faibles. En l'occurrence, il apparaît que toute approche basée sur le prélèvement de sang (lymphocytes) et sur un traitement rapide (quelques heures à quelques jours) ont des performances statistiques plus faibles que les tests basés sur les fibroblastes de peau et des traitements longs (entre le jour et la semaine comprenant l'amplification cellulaire, l'irradiation et le temps de réparation)<sup>294</sup>.

En plus du pouvoir prédictif, le modèle de transit d'ATM est un modèle mécanistique qui nous a permis de décrire la radiosensibilité humaine en 3 groupes.

La protéine ATM est une grosse protéine dont la mobilité et la durée de vie dans la cellule sont limitées. Les formes cytoplasmiques de la protéine ATM sont dimériques, chacun des monomères phosphorylant l'autre avec son domaine kinase<sup>295</sup>. Nous avons fait l'hypothèse que l'oxydation provoquée par les radiations monomérisent les dimères d'ATM d'une façon proportionnelle à la dose<sup>166</sup>. Cette monomérisation permet la diffusion des protéines ATM à travers la membrane nucléaire pour arriver au noyau. Dans le cas de fortes doses, la concentration des monomères ATM est telle qu'une redimérisation d'un grand nombre de monomères dans le cytoplasme est possible. Elle limite alors la diffusion dans le noyau figure 25. Une fois dans le noyau, les monomères ATM phosphorylent les histones H2AX sur le site des CDB ce qui permet leur reconnaissance par le mode de réparation des CDB par suture. En parallèle, ATM phosphoryle la protéine MRE11 qui inhibe son activité nucléasique et limite donc l'instabilité génomique. Les monomères ATM se redimérisent ensuite et sont visibles sous forme de foci nucléaires quantifiables<sup>166,214</sup>. Au cours de leur transit du cytoplasme au noyau, les formes cytoplasmiques monomériques d'ATM peuvent rencontrer de substrats naturels de la protéine ATM (appelées X) qui, s'ils s'associent en grand nombre aux monomères d'ATM peuvent en retarder la diffusion.

Sur cette base mécanistique, 3 groupes de radiosensibilité ont été définis :

- le groupe I rassemble les patients radiorésistants dont les cellules montrent un transit cyto-nucléaire d'ATM rapide (quelques minutes après 2 Gy) qui permet une reconnaissance complète des CDB avant leur réparation par le mode de réparation par suture ;
- le groupe II rassemble les patients caractérisés par une radiosensibilité modérée mais significative avec un transit cyto-nucléaire d'ATM retardé par une surexpression de protéines X (plusieurs dizaines de minutes après 2 Gy). Les patients du groupe II sont prédisposés aux cancers et peuvent montrer des grades de sévérités allant jusqu'à 4 ;
- le groupe III rassemble les patients hyper-radiosensibles (risque de décès après irradiation) et prédisposés aux cancers. Ces patients sont porteurs de mutations homozygotes d'ATM ou de ligase IV et montrent un défaut massif de réparation des CDB. Toute radiothérapie leur est fatale.



**Figure 25 :** Représentation schématique du modèle de transit d'ATM. L'oxydation provoquée par les radiations monomériser les dimères d'ATM et permet la diffusion des protéines ATM à travers la membrane nucléaire pour arriver au noyau et activer les mécanismes de réparation de l'ADN endommagée par l'exposition.

#### 2.4.6.4 Les applications du transit cytonucléaire d'ATM

En plus de la prédiction de la radiosensibilité au niveau clinique et de l'explication mécanistique du pouvoir protecteur de la combinaison statines+bisphosphonates, le modèle de transit d'ATM a permis d'élucider 3 questions majeures de la radiobiologie :

- le modèle linéaire-quadratique (LQ), formule de base de la radiobiologie, liant la survie cellulaire à la dose de radiation restait empirique (sans explication biologique) depuis les années 1970. En modélisant mathématiquement le transit cyto-nucléaire de la protéine ATM, il apparaît que les dommages létaux sont soit des CDB reconnues par ATM mais non-réparées soit des CDB non-reconnues par ATM. Le nombre de ces deux types de CDB varie respectivement soit proportionnellement à la dose, soit avec le carré de la dose. Grâce au modèle du transit cyto-nucléaire de la protéine ATM, pour la première

fois, une interprétation biologique à la formule LQ a été fournie (Bodgi et Foray 2016 IJRB), ce qui montre la pertinence scientifique de ces bases moléculaires.

- Certains syndromes génétiques causés par la mutation de protéines cytoplasmiques sont associés à une radiosensibilité de groupe II. C'est notamment le cas de la neurofibromatose de type I<sup>296</sup>, la tubéreuse de Bourneville<sup>297</sup>, Xeroderma Pigmentosum D<sup>298</sup> et la maladie de Huntington<sup>292</sup>. Pour ces syndromes, nous avons identifié les protéines X substrats d'ATM dont la surexpression dans le cytoplasme et la séquestration des monomères d'ATM limite l'activité kinase de ATM dans le noyau.

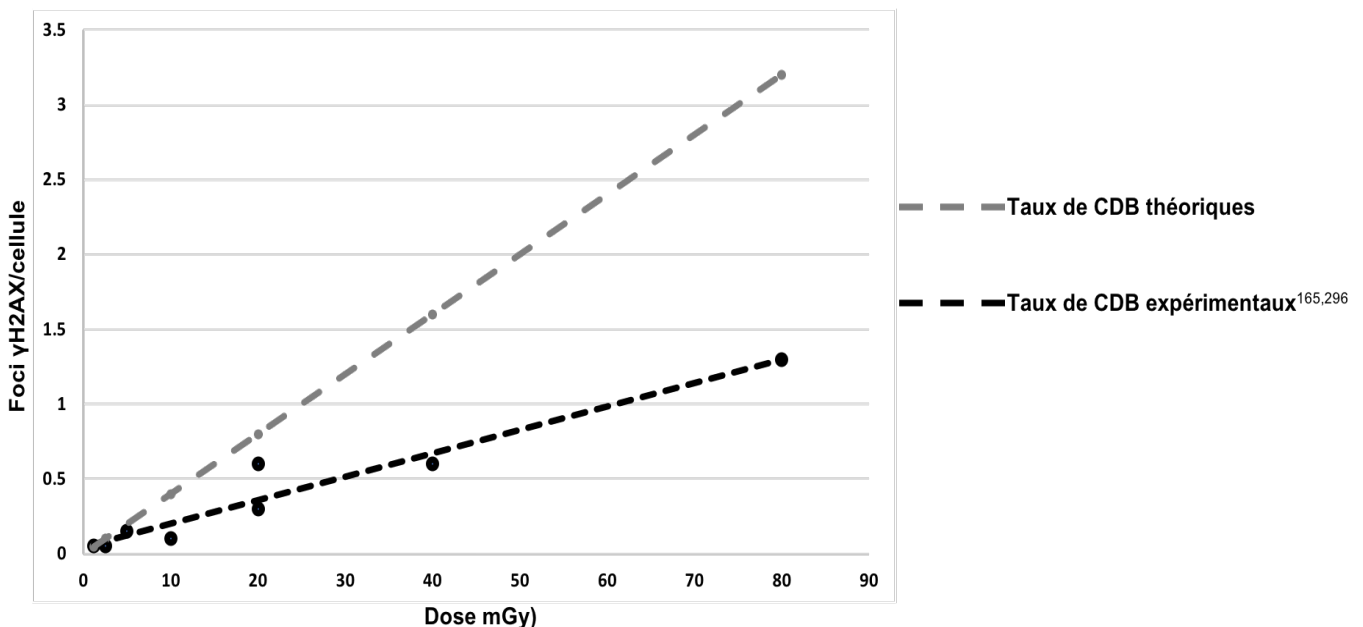
#### **2.4.6.5 Synthèse**

Aujourd'hui le modèle de transit cyto-nucléaire d'ATM apparaît comme un ensemble cohérent pour expliquer mécaniquement toute la gamme de radiosensibilité humaine aux fortes doses. A ce titre, c'est la seule source d'explication fiable pour justifier la formule LQ. Toutefois, en dépit de ces succès et de son utilité dans la prédiction de la radiosensibilité clinique observée en radiothérapie, le transit cyto-nucléaire d'ATM n'a pas encore été confronté pour résoudre l'énigme des effets radiobiologiques spécifiques aux faibles doses comme la réponse adaptative et l'hormésis.

## 2.4.7 Spécificités des faibles doses

### 2.4.7.1 Cassures double-brin et faibles doses

Comme on l'a vu plus haut, les rayonnements ionisants induisent une variété de lésions de l'ADN parmi lesquelles les cassures double-brin (CDB) sont les plus importantes du point de vue biologique. En effet, si ces cassures ne sont pas réparées, elles peuvent entraîner la mort cellulaire. Si elles sont mal réparées, elles peuvent provoquer une étape précoce vers la carcinogenèse. À l'heure actuelle, il n'est pas certain que la réparation des CDB soit aussi efficace pour les faibles doses qu'elle ne l'est pour les expositions à des doses élevées<sup>214,299</sup>. Lobrich et rothkamm<sup>167</sup> ont montré en 2003 que pour des doses de 20, 5 et 1,2 mGy, le taux d'induction des foci  $\gamma$ H2AX était respectivement de 0.6, 0.15 et 0.05. Dans une autre étude<sup>299</sup>, pour des doses de 80, 40, 20, 10 et 2.5 mGy le taux d'induction des foci  $\gamma$ H2AX était respectivement de 1.3, 0.6, 0.3, 0.1 et 0.05. Dans les cellules irradiées, le nombre de cassures double-brin est proportionnel à la dose. Pour une irradiation de 1Gy, 40 CDB sont induites. Si on applique ce taux sur les doses utilisées dans les deux études citées auparavant, on obtiendrait donc pour 80, 40, 20, 10, 2,5 et 1,2 mGy les taux de  $\gamma$ H2AX suivant : 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, 0.1 et 0.048. Les taux expérimentaux sont systématiquement plus faibles que ceux calculés (figure 26).



**Figure 26 :** Comparaison des taux de CDB expérimentaux et théoriques en faibles doses<sup>167,299</sup>.

Il semblerait donc qu'il y ait un manque de reconnaissance des CDB dans ces gammes de doses faibles. C'est un phénomène que l'on observe généralement à des doses plus élevées dans les lignées fibroblastiques primaires radiosensibles<sup>122</sup>. Or, les deux lignées de fibroblastes primaires utilisées dans ces études (HSF1 et MRC5) sont connues pour être des lignées radiorésistantes. En plus de ce manque de détection des cassures, étonnamment, les cassures double-brin induites par les très faibles doses de rayonnement (2,5 et 1,2 mGy) ne sont pas réparées pendant plusieurs jours, ce qui contraste fortement avec la réparation efficace des CDB qui est observée à des doses plus élevées<sup>167,299</sup>. Il semblerait donc qu'il y ait un seuil de dose pour lequel les mécanismes de réparation s'activent et répondent efficacement pour réduire le nombre de CDB induites dans les fibroblastes humains.

***Ces résultats contrastent avec les modèles actuels d'évaluation des risques qui supposent que les réponses cellulaires sont aussi efficaces à faible dose qu'à forte dose. D'autres phénomènes remettent en cause la linéarité des effets biologiques en faibles doses. C'est notamment le cas de l'hormésis, de la réponse adaptative et de l'hypersensibilité aux faibles doses.***

#### **2.4.7.2 L'hormésis et la réponse adaptative**

*Le jargon scientifique est souvent source de confusion, notamment lorsque l'emploi actuel d'un terme spécifique ne correspond pas nécessairement à sa définition historique, ou lorsqu'il est utilisé dans un domaine de recherche différent de celui dont il a été défini. Les termes "réponse adaptative" et "hormésis" sont des exemples typiques de cette confusion<sup>102,300,301</sup>. Nous avons publié pendant cette thèse deux publications distinctes sur ce sujet<sup>302,303</sup>.*

**La Réponse Adaptative (RA)**, est un terme ancien largement utilisé au XIX<sup>ème</sup> siècle en biologie évolutionnaire pour évoquer une adaptation à long terme d'un organisme pour quelques générations<sup>304</sup>. Progressivement, la notion de temps nécessaire à l'adaptation a disparu et la définition suivante de la RA est maintenant proposée : La RA est " un processus d'adaptation qui permet de survivre dans des conditions défavorables "<sup>305</sup>. En 1984, Olivieri et al. ont introduit pour la première fois ce terme dans le domaine de la recherche sur les rayonnements pour décrire un phénomène radiobiologique survenant après deux doses successives<sup>306</sup> : la première, la dose,

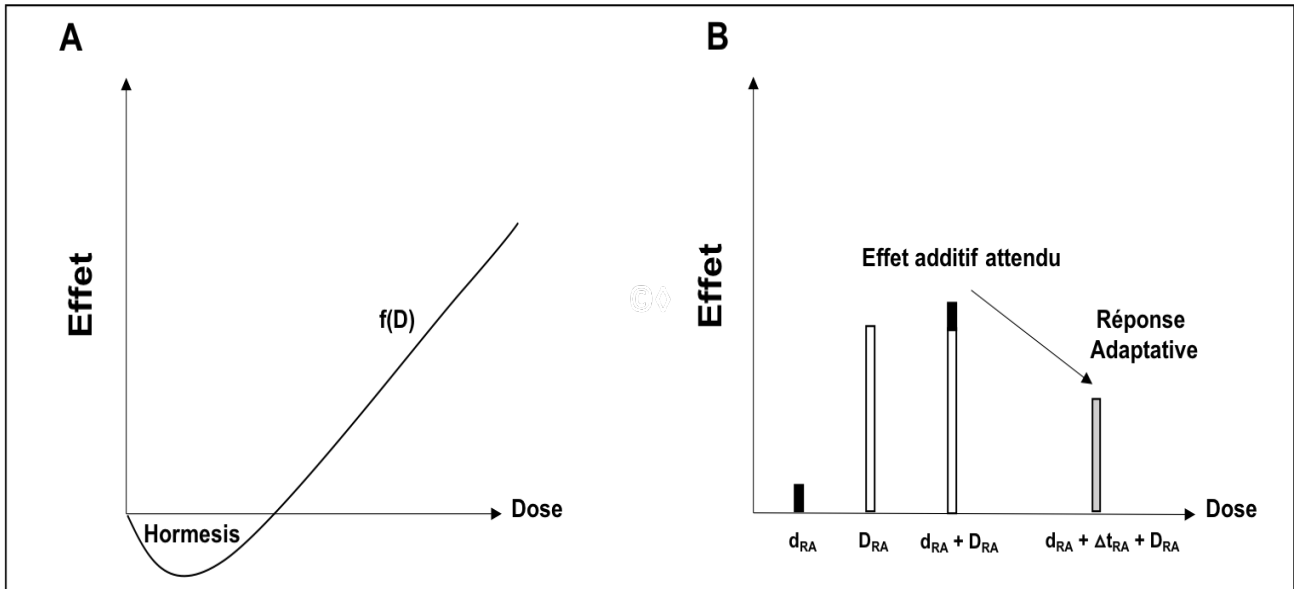


appelée « priming dose » ( $d_{RA}$ ), précède une certaine période de temps ( $\Delta t_{RA}$ ) et une dose plus élevée appelée « challenging dose » ( $D_{RA}$ ). Le phénomène RA se produit lorsque l'effet de  $d_{RA} + \Delta t_{RA} + D_{RA}$  est inférieur à celui de  $D_{RA}$ <sup>306</sup> (figure 27). La dose  $D_{RA}$  produit systématiquement des effets délétères et/ou mortels. La dose primaire  $d_{RA}$  est généralement interprétée comme un stimulus des défenses cellulaires pour répondre à  $D_{RA}$ <sup>307,308</sup>. Cependant, la nature de ces défenses n'avait toujours pas été identifiée jusqu'à présent.

**L'hormésis**, (du grec ancien, stimulus) est plus récent et moins fréquemment utilisé que la RA. "Hormésis " a été introduit pour la première fois en 1943 par Southam et Ehrlich qui ont découvert que les extraits d'écorce de cèdre rouge stimulaient la croissance de certains champignons à de faibles concentrations et étaient toxiques à de fortes concentrations<sup>309</sup>. T.D. Luckey a introduit pour la première fois le terme "hormésis" dans le domaine de la recherche sur les rayonnements dans les années 1980 pour décrire un phénomène dépendant de la dose en forme de J ou de U, impliquant que l'hormésis est une fonction continue de la dose (ou débit de dose). Il y aurait donc une dose seuil spécifique en-deçà de laquelle l'exposition au stress est « positive » et au-dessus de laquelle le stress est « nuisible »<sup>310,311</sup>. La nature non linéaire du phénomène hormésis a été un aspect important du débat sur le modèle linéaire sans seuil<sup>312,313</sup>. La notion d'*effet stimulant* a été progressivement remplacée par la notion d'*effet bénéfique*, par opposition à l'effet toxique observé à fortes doses.

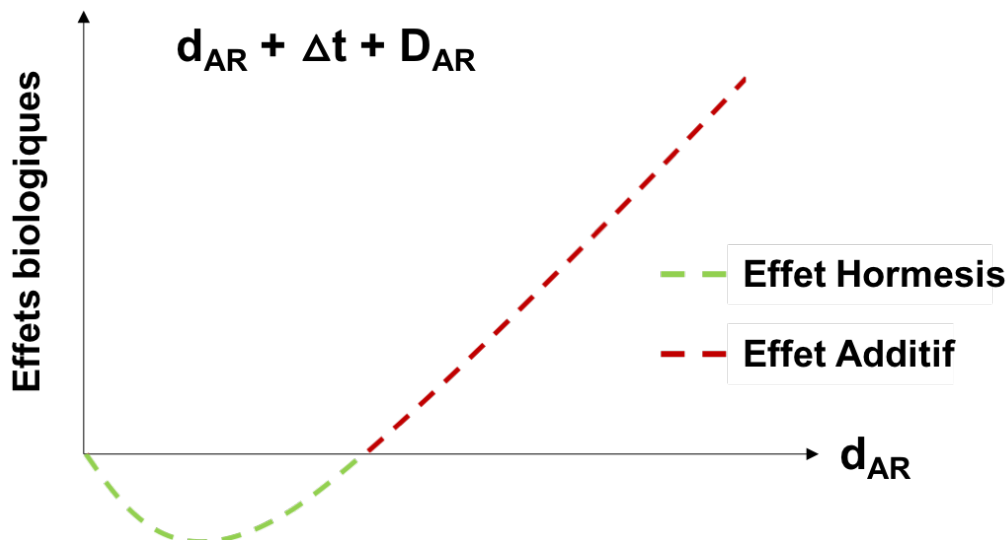
Paradoxalement, la définition de l'hormésis en radiobiologie, suggère l'existence d'une première dose (le "stimulus") alors que l'hormésis n'était pas décrite comme se produisant après une succession de doses. Réciproquement, la définition de la réponse adaptative suggère une adaptation à long terme alors que le temps entre les doses  $d_{RA}$  et  $D_{RA}$  est court (quelques heures). Enfin, si les données RA sont tracées en fonction de la priming dose  $d_{AR}$ , une courbe en J apparaît (figure 28), ce qui démontre que la RA pourrait être considérée comme un phénomène hormétique. Cependant, l'inverse n'est pas vrai : toutes les données d'hormésis, notamment celles obtenues à partir d'une dose unique, ne peuvent être décrites comme un phénomène RA<sup>302</sup>. Par conséquent, ces définitions, fondées sur des données historiques et correspondant à des protocoles expérimentaux spécifiques, suggèrent que la RA peut conduire à une réduction du risque lié à une dose élevée ( $D_{RA}$ ) par une autre dose plus

faible ( $d_{RA}$ ), tandis que l'hormésis décrit des effets biologiques bénéfiques sans induction d'une autre dose. De plus, l'hormésis et la RA ne se produisent pas nécessairement dans la même gamme de doses : le  $D_{RA}$  est généralement équivalent à quelques Gy, tandis que l'hormésis est observé à des doses beaucoup plus faibles allant du mGy au cGy comme la dose  $d_{RA}$ <sup>314</sup>.



**Figure 27. Différences entre l'hormésis et le phénomène de réponse adaptative.**

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



**Figure 28** : Schéma représentant l'effet hormésis dans réponse adaptative en fonction de  $d_{AR}$

*Les mécanismes moléculaires de la réponse adaptative et de l'hormésis sont peu connus mais pourraient être très similaires étant donné que la RA peut être considérée comme un phénomène hormétique. Ces phénomènes se produisant dans la même gamme de doses que le radiodiagnostic et notamment les examens scanographiques, il est important de s'y intéresser. La RA semble d'ailleurs dépendre de la radiosensibilité individuelle, tant en termes de fréquence que d'ampleur<sup>315,316</sup>.*

*C'est pourquoi, dans les revues réalisées dans cette thèse<sup>302,303</sup>, nous avons systématiquement passé en revue les protocoles expérimentaux, les modèles cellulaires et les paramètres biologiques et cliniques liés à l'hormésis et à la RA disponibles dans la littérature. Afin d'éviter tout biais inter-espèces potentiels, nous nous sommes concentrés uniquement sur les données humaines.*

## 2.4.7.2.1 Réponse adaptative

### 2.4.7.2.1.1 La RA à travers l'histoire : Une pléthore de protocoles différents

Nous avons identifié 3 périodes historiques dans la recherche sur la Réponse Adaptative :

*Période de 1984 à 1989* : Historiquement, le premier rapport sur la RA dans les cellules humaines a été publié en 1984 par Olivieri et al<sup>306</sup>. Les auteurs ont pré-incubé des lymphocytes humains avec de la thymidine tritiée ( $0,1-0,01 \mu\text{Ci.mL}^{-1}$ ) pendant 2 ou 3 jours et appliqué une dose de rayons X de 1,5 Gy par la suite. Dans ces conditions, le taux d'aberrations chromosomiques des deux expositions successives est apparu inférieure au taux d'aberrations induites par la thymidine tritiée et les rayons X séparément. Entre 1984 et 1989, le même groupe de recherche a publié quelques variantes de ce protocole notamment avec des doses uniques ( $d_{\text{RA}}+\Delta t_{\text{RA}}+D_{\text{RA}}$ ) et les gammes de doses suivantes : (0,01 à 0,05 Gy) pour  $d_{\text{RA}}$ , (16-32 h) pour  $\Delta t_{\text{RA}}$ , et (0,25-1,5 Gy) pour  $D_{\text{RA}}$ <sup>316-322</sup>. Sanderson et Morley<sup>322</sup> et Sankaranarayanan et al<sup>323</sup> sont arrivés aux mêmes conclusions avec un protocole d'irradiation similaire, mais avec la fréquence de mutations géniques comme paramètre biologique. En 1989, Bosi et Olivieri soulèvent pour la première fois la question de la réponse individuelle à la RA. Avec le même protocole expérimental que celui utilisé en 1984, la RA a été analysée dans les lymphocytes de 18 donneurs : environ 10 % des donneurs n'ont pas montré de RA et environ 20 % d'entre eux ont présenté une synergie. Par conséquent, à la fin des années 1980, il fut suggéré que le phénomène RA dépendait du statut individuel et qu'il pouvait se produire dans les lymphocytes humains quand on prend le taux d'aberrations chromosomiques ou la fréquence des mutations géniques comme paramètres d'évaluation. La RA pourrait ainsi entraîner une réduction de l'instabilité génomique, de la transformation cellulaire et donc de la prédisposition au cancer.

*Période de 1990 à 1999* : Dans les années 1990, des protocoles expérimentaux similaires ont été appliqués, mais avec des protocoles un peu différents que ceux observés dans les années 1980 : (0,005 - 0,05 Gy) pour  $d_{\text{RA}}$ , (1-48 h) pour  $\Delta t_{\text{RA}}$ , et (0,25-6 Gy) pour  $D_{\text{RA}}$ <sup>315,324-334</sup>. De nouveaux modèles cellulaires (ex : fibroblastes) et de nouveaux critères d'évaluation (ex : survie cellulaire) furent étudiés. En ce qui concerne la survie cellulaire, Raaphorst et Boyden montrèrent que la RA dépendait

fortement des lignées cellulaires et également du  $\Delta t_{RA}$  (mais avec des valeurs  $d_{RA}$  entre 0,5 et 2 Gy, c'est-à-dire 10 fois plus élevées que les valeurs citées ci-dessus)<sup>315</sup>. Avec des fibroblastes humains et des cellules tumorales, Seong et al. ont confirmé l'influence du  $\Delta t_{RA}$  sur les effets du phénomène RA. Dans leurs conditions, si  $\Delta t_{RA}$  était inférieur à une heure ou supérieur à 30 heures, la RA ne se produisait pas<sup>329</sup>. Cette période de 1990 à 1999 a été particulièrement marquée par un nombre croissant de publications sur le facteur individuel dans le phénomène de RA. Cependant, le profil génétique requis pour la survenue de ce phénomène n'a pas été clairement défini.

*De 2000 à 2007 :* A partir des années 2000, l'importance considérable des progrès technologiques permirent d'étudier l'expression des protéines induites par la RA<sup>335-337</sup>, la méthylation de l'ADN<sup>338</sup>, la réparation et la signalisation des dommages à l'ADN évaluées à l'aide de diverses techniques<sup>339-341</sup> et les voies de mort cellulaire<sup>335,342-344</sup>. Les gammes de  $d_{RA}$ ,  $\Delta t_{RA}$  et  $D_{RA}$  utilisées dans les rapports publiés à partir de 2000 étaient similaires à ceux observés dans les années 1980 et 1990 : (0,001-0,5 Gy) pour  $d_{RA}$ , (2-24 h) pour  $\Delta t_{RA}$ , et (0,1-5 Gy) pour  $D_{RA}$ <sup>335-350</sup>. Tous les paramètres testés au cours de cette période ont été liés à des dommages non réparés ou mal réparés de l'ADN, à la fréquence de mutations, à la fréquence des transformations cellulaires ou à la mort cellulaire. Ainsi, au cours de cette période, la RA semble réduire soit le risque de cancer radioinduit, soit la radiosensibilité cellulaire. Rappelons que ces deux notions ne sont pas nécessairement liées. Par exemple, pour une lignée cellulaire donnée, certains auteurs ont observé une réponse RA significative avec les mutations géniques comme paramètre mais pas avec la survie clonogénique<sup>350</sup>. Il faut aussi souligner que certains auteurs ont considéré l'apoptose comme une forme de phénomène protecteur et bénéfique dans la mesure où ce type de mort pourrait tuer spécifiquement les cellules instables et réduire le cancer<sup>335</sup>. Il faut être prudent avec une telle hypothèse, puisque l'apoptose est une voie de mort cellulaire très spécifique, fortement dépendant de l'état de p53 et du type de cellule<sup>216</sup>. À partir des années 2000, la majorité des publications sur la RA ont porté sur la réponse individuelle avec une variété impressionnante de types de cellules : lymphocytes, cellules lymphoblastoïdes, fibroblastes primaires et transformés, kératinocytes, cellules épithéliales mammaires et cellules tumorales, ce qui suggère que la RA n'est pas un phénomène spécifique à un tissu particulier. De plus, puisque tous les modèles cellulaires RA positifs montrent diverses voies de mort cellulaire, l'apoptose ne peut être une caractéristique spécifique

du phénomène. Jusqu'à ce jour, il n'existe toujours pas de définition claire du profil individuel, génétique et cellulaire requis pour rendre possible la réponse adaptative.

En résumé, depuis les années 1980 jusqu'à aujourd'hui, la RA a été observée avec le scénario  $d_{RA} + \Delta t_{RA} + D_{RA}$  et avec les valeurs suivantes : (0,001-0,5 Gy) pour les  $d_{RA}$ , entre 1 et 48 h pour le  $\Delta t_{RA}$  et entre 0,1 et 6 Gy pour le  $D_{RA}$ . A l'exception notable des travaux du groupe d'Olivieri qui ont utilisé la thymidine tritiée, dans la grande majorité des cas (> 83 %)  $d_{RA}$  est délivrée en moins d'une minute (c'est à dire à des débits de dose allant de 1 mGy.min<sup>-1</sup> à 1 Gy.min<sup>-1</sup>). La  $D_{RA}$  est généralement délivrée en moins de 5 minutes à environ 1 Gy.min<sup>-1</sup>.

#### **2.4.7.2.1.2 Influence des valeurs $d_{RA}$ , $\Delta t_{RA}$ et $D_{RA}$ sur la AR**

Quand on fait la revue des protocoles concernant la RA, il est remarquable de constater que la priming dose  $d_{RA}$  est, dans plus de 90 % des études, inférieure à 0.05 Gy mais supérieure à 0.001 Gy. Comme on l'a vu plus haut, le stress oxydatif causé par 1 Gy de rayons X ou  $\gamma$  induit simultanément environ 10 000 dommages de base (DB), 1000 cassures simple-brin d'ADN (CSB), et 40 cassures double-brin d'ADN (CDB) par cellule diploïde humaine. Ces taux d'induction de dommages de l'ADN ne dépendent pas de la radiosensibilité des cellules<sup>216</sup>. Par conséquent, la priming dose  $d_{RA}$  induit généralement moins de 500 DB, 50 CSB, et 2 CDB par cellule. Ces chiffres correspondent à un stress oxydatif significativement plus faible que celui induit par les dommages spontanés de l'ADN habituellement observés dans les cellules radorésistantes humaines<sup>122</sup>. Par conséquent, de tels dommages de l'ADN ne peuvent affecter de façon significative la survie cellulaire ni l'instabilité génomique. En revanche, dans les cellules radiosensibles, le stress oxydatif dû à l'instabilité génomique spontanée cause une quantité faible mais significative de dommages de l'ADN, plus importante que celle observée dans les cellules radorésistantes<sup>122</sup>. Ainsi, seulement dans les cellules radiosensibles, le stress oxydatif spontané ajouté à celui causé par la dose initiale  $d_{RA}$  peut entraîner une quantité significative de dommages de l'ADN. Ainsi, si un certain niveau de stress oxydatif est requis pour la survenue d'un phénomène RA, il devrait se produire de préférence dans les cellules radiosensibles. Les périodes moyennes de réparation sont d'environ 5 à 10 min pour les DB, 10 à 20 min pour les CSB et 50 à 60 min pour les CDB.

L'examen des protocoles de RA révèle que le  $\Delta t_{RA}$  est fortement dépendant des valeurs  $d_{RA}$  et  $D_{RA}$  et qu'il est généralement supérieur à 1 h mais inférieur à 24 h. Dans les cellules radiorésistantes, 24 h post-irradiation correspond à une réparation complète de tous les dommages de l'ADN induits par le  $d_{RA}$ . En revanche, dans les cellules radiosensibles, il est possible que certaines CDB restent non réparées ou mal réparées après  $d_{RA} + \Delta t_{RA}$ . Les protéines de réparation et de signalisation de l'ADN peuvent donc encore être activées pendant et après  $d_{RA} + \Delta t_{RA}$ . Par conséquent, comme on l'a supposé plus tôt et comme le suggère la littérature, la RA devrait être beaucoup moins fréquente dans les cellules radiorésistantes puisque  $d_{RA} + \Delta t_{RA}$  ne produit pas d'effet biologique significatif avant l'exposition au  $D_{RA}$ .

Dans la grande majorité des cas, le  $D_{RA}$  est supérieur à 0,5 Gy et fréquemment de 2 Gy, ce qui correspond à une dose élevée (la dose de 2 Gy est généralement celle administrée par séance de radiothérapie). Comme défini par notre laboratoire, une dose de 2 Gy génère une fraction de survie à 2 Gy (SF2) variant respectivement de 1 à 10 %, de 10 à 60 % et de 60 à 80 % pour les cellules humaines respectivement hyperradiosensibles, modérément radiosensibles et radiorésistantes<sup>122,351,352</sup>. Lorsque l'on examine la littérature, on n'observe pas de RA dans les cellules dont la SF2 est inférieure à 10 % et supérieur à 60 %, ce qui confirme que la RA est plus souvent observée dans les cellules montrant une radiosensibilité intermédiaire. Cette conclusion est également en accord avec le fait que la radiorésistance est une "notion bornée" : Les cellules ne peuvent pas réparer plus de dommages de l'ADN lorsque la réparation de l'ADN est déjà complète et que le SF2 ne dépasse pas 80 % dans les cellules humaines<sup>122,351,352</sup>. Inversement, dans les cellules hyperradiosensibles, la quantité de mort cellulaire ou de mutations est si élevée (l'effet du  $d_{RA} + \Delta t_{RA}$  est déjà délétère) que les conséquences biologiques d'une exposition au  $D_{RA}$  sont irréversibles.

#### **2.4.7.2.1.3 L'importance du modèle cellulaire pour la RA**

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

- Dans le cas des lymphocytes circulants, tous les donneurs ne sont pas nécessairement RA positifs et le rapport entre les donneurs positifs et négatifs varie selon les études. Aucune explication génétique n'est fournie.

- Dans les cellules humaines RA positives hormis les lymphocytes circulants répertoriés, plus de 50% sont des lignées cellulaires tumorales, 30% sont des cellules immortalisées ou transformées et plus de 75 % sont connues pour être radiosensibles.

Ces remarques confirment la conclusion selon laquelle l'apparition de la RA est favorisée lorsque les cellules présentent un niveau anormalement élevé d'instabilité génomique et/ou de radiosensibilité. Par exemple, la réduction de la fréquence des mutations causées par la RA est plus facilement mesurable dans un modèle cellulaire dans lequel des mutations délétères sont déjà présentes (comme dans les lignées cellulaires immortalisées ou tumorales)<sup>350</sup>. Dans le cas de fibroblastes primaires radiorésistants humains présentant une RA, la RA se produit lorsque la  $D_{RA}$  est égale ou supérieure à 4 Gy. À une telle dose, le taux de micronoyaux est mesurable même dans les cellules radiorésistantes<sup>347</sup>. Cependant, si le niveau d'instabilité génomique et/ou de radiosensibilité est trop élevé, la RA ne peut pas atténuer les dommages irréversibles. Lorsque la survie cellulaire a été utilisée comme critère d'évaluation, Raaphorst et Boyden ont montré que la Sk-Mel-3 hyper-résistante ne montre pas de RA<sup>315</sup>. Dans le même article, les lignées de cellules tumorales HT144 hyper-radiosensibles ne présentent pas de RA puisque l'effet de la  $d_{RA} + \Delta t_{RA}$  est déjà délétère.

Tous ces exemples suggèrent que la RA se produit préférentiellement dans les cellules présentant une radiosensibilité intermédiaire. La RA peut cependant se produire dans les cas de cellules radiorésistantes, mais à des doses non pertinentes sur le plan biologique<sup>347</sup>.

#### **2.4.7.2.2 L'hormésis**

##### **2.4.7.2.2.1 L'hormésis dans les cellules humaines**

Il existe très peu de données concernant l'hormésis sur les cellules humaines. La large majorité de la littérature est composée de critiques, de commentaires ou de lettres. Les articles contenant des données originales représentent seulement un tiers de l'ensemble des publications et seulement 25% d'entre-elles concernent l'humain<sup>312,313,353-373</sup>. Il est à noter que cet inventaire n'a pas pris en compte les articles



relatifs à la RA qui ne font pas référence à "radiation hormesis" dans leur titre ou leur résumé et les articles dans lesquels "radiation hormesis" est seulement cité dans le corps du texte. Cependant, même dans les articles sur la RA, peu d'entre eux ont porté sur des données humaines<sup>302</sup>. Cette analyse documentaire est conforme à l'énoncé selon lequel les données sur les animaux/plantes/micro-organismes représentent la grande majorité des rapports accumulés sur les effets des expériences à faibles doses et à faible débit de dose.

#### **2.4.7.2.2 Trois conclusions sur l'hormésis**

- Il existe très peu de données humaines sur l'hormésis. Le taux de croissance, le développement de la croissance, la reproduction, l'immunité, l'incidence du cancer et la durée de vie ont d'abord été considérés par T.D. Luckey comme les principaux paramètres utilisés dans ces données<sup>310</sup>.
- Parmi les données humaines sur l'hormésis, les expériences *in vitro* concernent principalement des cellules transformées ou tumorales, ce qui pose la question de la spécificité du phénomène vis-à-vis du type de cellules. En effet, même si les cellules transformées, immortalisées ou tumorales sont faciles à amplifier *in vitro* grâce à leur capacité de croissance en culture, elles ne reflètent pas nécessairement toutes les spécificités de la réponse au rayonnement des tissus sains.
- Parmi les données humaines sur l'hormésis, les études épidémiologiques concernent généralement l'incidence du cancer ou la mortalité par cancer des survivants de la bombe A, ce qui soulève le paradoxe apparent que l'hormésis peut stimuler la croissance cellulaire dans les expériences *in vitro* tout en consistant à réduire l'incidence du cancer lorsque les données épidémiologiques sont considérées. Ces trois points sont discutés ci-après.

#### **2.4.7.2.3 L'hormésis et les données animales**

Il existe au moins deux grandes différences inter-espèces dans la réponse aux rayonnements : elles concernent les voies de réparation de l'ADN et la taille du noyau :

- Comme on l'a dit plus haut, il y a deux grandes voies de réparation des CDB<sup>216</sup> :

- La jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) consiste à relier les extrémités d'ADN brisées. Cette voie est active dans les cellules quiescentes et donc prédominante chez les mammifères et surtout chez l'homme.

- la voie de recombinaison, homologue ou non homologue, consiste à insérer un fragment d'ADN dans le trou formé par la rupture de l'ADN. Chez les mammifères, la contribution relative de la voie de recombinaison est faible, surtout chez les humains et dans les cellules non tumorales. Cependant, dans le cas des syndromes associés à la prédisposition au cancer, le manque de contrôle de la recombinaison peut générer une accumulation significative d'erreurs et donc des CDB mal réparées. C'est le phénomène d'hyper-recombinaison. L'hyperrecombinaison est associée à des mutations hétérozygotes de BRCA1, BRCA2, p53, BLM, FANC, NF1 qui présentent un risque élevé de cancer. De même, l'activité exacerbée de la recombinaison est une caractéristique courante des cellules transformées ou tumorales.

Selon la distribution des cellules dans les phases du cycle cellulaire et en raison de certaines autres spécificités, les modèles animaux/végétaux/micro-organismes peuvent différer significativement des modèles humains par le rapport NHEJ/voies de recombinaison.

- En plus de la compétition entre le NHEJ et la recombinaison, les espèces diffèrent par la longueur de leur génome qui conditionne la taille du noyau et donc la condensation de la chromatine. Par exemple, les noyaux cellulaires sont généralement plus petits et la condensation de la chromatine est généralement plus élevée chez les rongeurs que dans les cellules humaines. Par conséquent, chez l'homme, 1 à 2 CDB non réparées entraînent la mort cellulaire, alors que les rongeurs toléraient plus de CDB non réparées avant la mort cellulaire, ce qui les rend plus résistantes que les humains. Des arguments similaires sont également pertinents pour les autres espèces et pour les lignées de cellules tumorales<sup>216</sup>.

L'ensemble des caractéristiques détaillées ci-dessus explique les différences *quantitatives* mais aussi *qualitatives* entre les espèces. En particulier, les modèles animaux semblent être plus permissifs que les cellules humaines face aux mutations, aberrations, transformations et malformations. Les micro-organismes et les plantes sont beaucoup plus radiorésistants que les cellules humaines. Par conséquent, l'extrapolation à l'homme des données sur les animaux, les plantes et les micro-organismes est très complexe, dans la mesure où les doses de rayonnement

appliquées dans les expériences sont également différentes. Par exemple, la définition de "faibles doses" faite pour les humains n'est pas nécessairement pertinente pour les autres espèces. Par conséquent, l'apparition du phénomène d'hormésis observé chez les animaux/végétaux/micro-organismes ne peut être considérée comme une preuve de son existence chez l'homme. Ce dernier point est particulièrement vrai pour la diversité des réponses radiologiques dues à la radiosensibilité individuelle chez l'homme, alors que les modèles de rongeurs, de plantes ou de micro-organismes sont généralement le résultat d'un clonage spécifique.

#### **2.4.7.2.3 L'hormésis : expériences *in vitro* et *ex vivo***

Il existe deux types d'études *in vitro* sur l'hormésis dans les cellules humaines : celles qui concernent les effets à faible dose (FD) ou à faible débit de dose (FDD) et celles qui concernent les protocoles de RA. En ce qui concerne les études FD et FDD, une analyse rapide des données de la littérature montre que les protocoles expérimentaux varient considérablement d'un groupe de recherche à l'autre et qu'il n'existe même pas de consensus clair quant à la gamme de doses d'hormésis. En effet, de 1980 à 2018, les FDD étudiées variaient de 0,1 mGy.min<sup>-1</sup> à 0,5 Gy.min<sup>-1</sup> (en fait, cette dernière valeur ne peut être considérée comme un débit de dose "faible"). Par contre, les doses les plus fréquentes observées dans l'hormésis se situent entre 20 et 75 mGy. Par exemple, en utilisant un fibroblaste pulmonaire embryonnaire humain normal, Velegzhaninov et al (2018) ont montré qu'une dose unique de 30 à 50 mGy entraînait une diminution de la sénescence<sup>374</sup>.

Bien que la prolifération cellulaire ou la clonogénicité soient les critères d'évaluation les plus fréquemment utilisés dans les expériences *in vitro* sur l'hormésis dans les cellules humaines, l'analyse de la littérature suggère que l'hormésis est généralement observé dans des cellules normales mais pas dans les cellules tumorales. Il est intéressant de noter que l'hormésis est considéré comme un phénomène "bénéfique" lorsqu'une prolifération cellulaire accrue est observée alors que tout manque de contrôle de la croissance doit être considéré comme négatif, quel que soit le type de cellules. De plus, les lignées cellulaires dans lesquelles l'hormésis a été observé se sont révélées plutôt radiorésistantes. En revanche, il convient de noter que la RA a surtout été observée dans les cellules radiosensibles, ce qui révèle une différence importante entre l'hormésis et la RA<sup>302</sup>. Aucun mécanisme consensuel n'est proposé

pour expliquer l'hormésis dans les expériences *in vitro*. Les expériences *ex vivo* sur l'hormésis chez l'homme impliquent différents protocoles expérimentaux : elles consistent généralement à prélever du plasma sanguin ou des cellules sur des individus exposés entre 1 et 15 mSv/an. Cependant, la nature de l'exposition diffère radicalement dans cette série de données : résidents de bâtiments contaminés au cobalt 60 ou vivant à proximité d'une centrale nucléaire, travailleurs exposés, patients atteints d'une maladie neurodégénérative ou habitants des zones à fort rayonnement naturel. Comme pour les expériences *in vitro*, il n'y avait pas encore de consensus sur un modèle mécanistique pour expliquer ce phénomène.

#### **2.4.7.2.4 Hormésis chez l'homme : données épidémiologiques et cliniques**

L'exemple le plus célèbre de l'hormésis dans les études épidémiologiques est la diminution du risque de leucémie et/ou de la mortalité chez les survivants de la bombe atomique<sup>375,376</sup>. Les données d'Hiroshima suggèrent que le taux de mortalité par leucémie pour 100 000 personnes déterminé sur une période de 35 ans diminue significativement autour d'une exposition de 75 mGy<sup>377</sup>. Cependant, cette conclusion fait encore l'objet de controverses et de débats<sup>378,379</sup>. Il est intéressant de noter que d'autres rapports ont également montré que l'incidence du cancer ou la mortalité par cancer diminue lorsque l'exposition se situe dans la gamme de dose entre 20 et 75 mGy, notamment lorsque le cancer des ovaires, du côlon ou du sein sont considérés<sup>367,375</sup>.

En ce qui concerne les données des FDD, seuls trois rapports font état d'une incidence plus faible du cancer. Tous ces rapports concernent des zones surélevées (en altitude) aux Etats-Unis. Dans ces études, ces zones surélevées ont été considérées comme étant associées à une radioactivité naturelle plus élevée<sup>353,372,373</sup>. Toutefois, les coefficients de corrélation étaient faibles et le lien direct entre l'altitude et radioactivité naturelle peut être une source d'artéfacts. De plus, une analyse rigoureuse de la signification statistique des différences observées entre les valeurs de radioactivité naturelle n'a pas été effectuée. Une étude similaire a été menée en Pologne entre 0,5 et 4,6 mSv/an et présente des données plus convaincantes : pour la première fois, l'effet hormésis a été quantifié avec le débit de dose et défini comme une diminution de 1,17 %/mSv/an de tous les décès par cancer<sup>354</sup>. Cependant, cet effet n'a pas été

statistiquement significatif pour les cancers du poumon, probablement à cause du tabagisme qui représente un facteur de confusion majeur<sup>354</sup>. Il est intéressant de noter que ces données quantitatives ne sont pas compatibles avec un phénomène d'hormésis qui serait observé dans des zones de radioactivité naturelle plus élevées : en fait, si nous appliquons la règle de diminution de 1,17 %/mSv/an pour tous les décès par cancer, une diminution de plus de 70 % des décès par cancer serait prévue à Ramsar (Iran), la zone la plus radioactive du monde (70 mSv/an), ce qui n'a jamais été observé et aurait été très facile à mettre en évidence. Par conséquent, toutes ces données suggèrent que si l'hormésis est causée par la radioactivité naturelle, elle pourrait ne concerner que des zones à faible rayonnement naturel, ce qui contredit certaines hypothèses et surtout la croyance d'un effet bénéfique liée aux plus hauts rayonnements naturels. En d'autres termes, l'hormésis devrait concerner des zones de radioactivité naturelle inférieure à 2,5 mSv/an, ce qui correspond au rayonnement de fond moyen mondial et peut expliquer pourquoi l'effet hormésis ne peut être mesuré facilement.

En plus des données épidémiologiques, il existe des études cliniques sur l'hormésis, mais, celles-ci ne représentent qu'un nombre très réduit de cas. Les deux rapports référencés concernent un patient atteint de polyarthrite rhumatoïde traité par source chaude au radon et trois autres patients atteints respectivement de cancer de la prostate, de cancer de la prostate avec métastases osseuses et de colite ulcéreuse et soumis à un traitement répété à faible dose. En raison du faible nombre de cas et du fait qu'ils ne présentent pas d'arguments quantifiés, ces deux rapports ne peuvent être rigoureusement considérés comme une preuve significative de l'existence de l'hormésis chez l'homme.

#### **2.4.7.2.5 L'hormésis chez l'homme : quelques caractéristiques quantitatives**

D'après les données publiées sur les fiables doses, quelle que soit leur forme (in vitro, ex vivo, épidémiologique ou données sur la réponse adaptative), l'hormésis a été observé dans des cellules humaines à des doses spécifiques allant de 20 à 75 mGy administrées à un débit de dose élevé. En ce qui concerne les données FDD publiées, la plupart des études chez l'humain ont révélé un hormésis à un débit de dose

spécifique variant entre 0,4 et 15 mSv/an. Toutefois, il faut souligner que la robustesse statistique des données FD et FDD est inégale :

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

Dans les fibroblastes humains, une gamme de [20-75 mGy] correspond à 200-750 DB, 20-75 CSB et 0,8-3 CDB par fibroblaste et beaucoup moins par lymphocyte. À des doses inférieures à 25 mGy, on ne s'attend pas à ce qu'il y ait de CDB radioinduit. Aux doses inférieures à 1 mGy, on ne s'attend à aucune CSB radioinduites. Toutes ces valeurs sont du même ordre que les dommages spontanés à l'ADN habituellement évalués dans les cellules radiorésistantes humaines dans lesquelles on observe généralement 0-2 CDB spontanées<sup>122</sup>. Inversement, dans les cellules radiosensibles, il reste plus de dommages de l'ADN et aussi quelques dommages supplémentaires de l'ADN produits pendant la réparation à cause de l'instabilité génomique<sup>216</sup>. Par conséquent, ces données suggèrent qu'un phénomène d'hormésis se produisant à 20-75 mGy devrait être :

- observé plutôt dans les cellules radiorésistantes que dans les cellules radiosensibles.
- causé par un stress oxydatif qui facilite un processus biochimique ou biologique qui n'est pas nocif pour la cellule (c'est-à-dire équivalent à une dose sublétale). D'ailleurs, certains auteurs ont proposé le terme « eustress » pour décrire ce stress "positif"<sup>380</sup>. A notre connaissance, aucun modèle mécanistique reliant les aspects moléculaires, cellulaires et cliniques n'avait été proposé jusqu'à présent pour expliquer quantitativement le rôle positif d'un tel « eustress » dans les cellules radiorésistantes humaines.

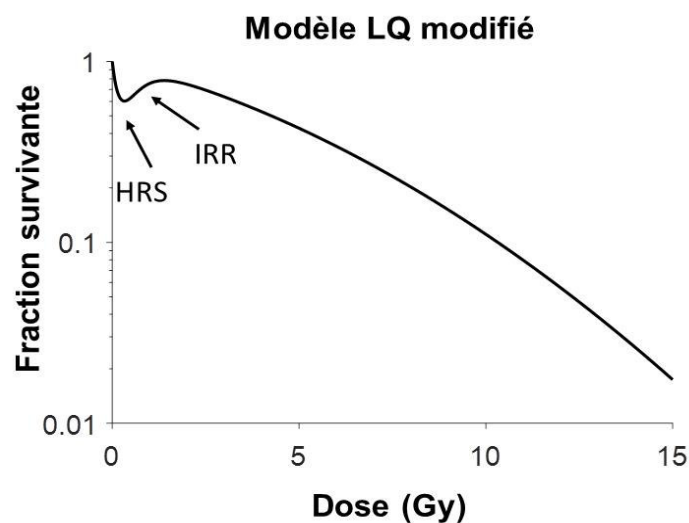
#### **2.4.7.3 L'hypersensibilité aux faibles doses**

Décrite pour la première fois par Lambin et al<sup>381</sup> et Marples and Joiner<sup>382</sup>, l'hyperradiosensibilité (Hypersensitivity to low dose (HRS) ou HFD en français) aux

faibles doses entraîne, pour une seule dose  $d_{\text{HFD}}$  située entre 1 et 800 mGy<sup>383</sup>, une réduction significative de la survie clonogénique et aboutit ainsi à un effet biologique équivalent à une dose beaucoup plus forte. La dose à laquelle on observe l'effet HFD le plus important sera nommée  $d_{\text{HFDmax}}$ . A des doses supérieures à  $d_{\text{HFDmax}}$ , la survie augmente progressivement et ce phénomène est appelé radiorésistance induite (ou IRR pour induced radioresistance) car de nombreux auteurs ont suggéré que cette remontée de la courbe était due à une activation des processus biologiques aboutissant à la radiorésistance. Pour décrire le phénomène HRS/IRR, Mike Joiner a proposé une modification empirique du modèle LQ pour ajuster les données expérimentales :

$$S(D) = e^{-\alpha_r \left[ 1 + \left( \frac{\alpha_s}{\alpha_r} - 1 \right) e^{-\frac{D}{d_c}} \right] D - \beta D^2} \quad (4)$$

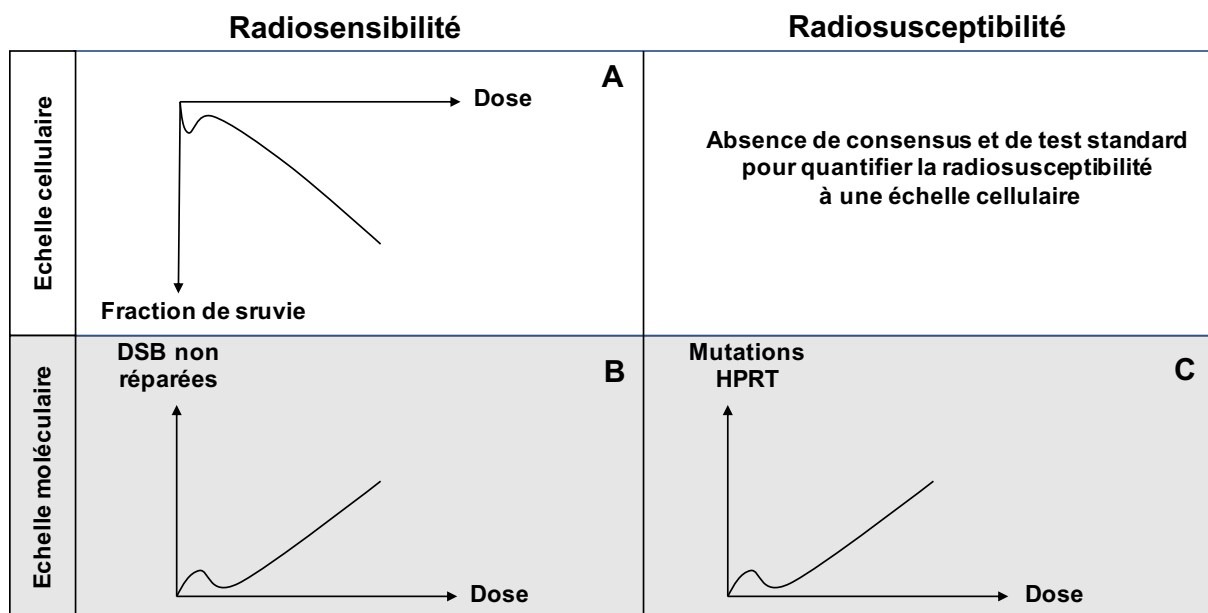
Joiner a ainsi considéré que le paramètre  $\alpha$  du modèle LQ n'est pas constant mais varie en fonction de la dose  $D$ . Le paramètre  $\alpha_s$  représente la pente initiale de la courbe de survie pour les très faibles doses ;  $\alpha_r$  représente la courbe initiale de la courbe de survie décrite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



**Figure 29 :** Représentation graphique de l'hypersensibilité aux faibles doses et du modèle LQ modifié pour le décrire.

Joiner a suggéré que ce phénomène pouvait être dû au changement de la conformation de la chromatine<sup>384</sup>. Le même groupe de recherche a également suggéré qu'il proviendrait d'un défaut des arrêts du cycle G<sub>2</sub>/M ATM-dépendants<sup>385</sup>. Enfin, d'autres études suggèrent que le phénomène dépendrait de la réparation des CDB mais sans donner de modèle mécanistique précis<sup>386,387</sup>.

L'hypersensibilité aux faibles doses n'est pas limitée à une diminution de survie cellulaire mais est également associée à une augmentation des CDB non réparées et une augmentation du nombre de micronoyaux. Ce phénomène ne concerne pas uniquement les voies de mort cellulaire et de radiosensibilité. En effet, ce phénomène a également été observé à travers un excès de mutations HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase) entre 1 et 500 mGy<sup>388</sup>.



**Figure 30** : Illustration schématique de l'hypersensibilité aux faibles doses (HFD) par la différence entre radiosensibilité et radiosusceptibilité. La survie cellulaire (**A**) ou les cassures double-brin non réparées (DSB ; **B**) sont les paramètres les plus pertinents pour quantifier la radiosensibilité (risque de réactions tissulaires attribuables à la mort cellulaire). Le taux des mutations de l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyle transférase (HPRT) (**C**) est l'un des paramètres les plus pertinents pour quantifier la radiosensibilité (risque de cancer radioinduit). Il convient de noter que le paramètre qui quantifie la transformation cellulaire n'est pas encore consensuel.



La HFD ne peut pas tuer *spécifiquement* les cellules tumorigènes, comme certains auteurs le suggéraient pour expliquer les aspects bénéfiques des radiations<sup>167,389</sup> : ce phénomène peut produire un excès de transformation cellulaire (radiosusceptibilité) et/ou un excès de mort cellulaire (radiosensibilité)<sup>388</sup> (figure 30).

De plus, l'ampleur maximale de la HFD observée dans les cellules humaines est généralement limitée à 25 % de survie cellulaire : même si la HFD tuait spécifiquement les cellules tumorigènes, son action serait limitée à une minorité de cellules irradiées<sup>390</sup>.

L'ampleur maximale de la HFD a été observée à une dose de  $d_{\text{HFDmax}}$  entre 0,1 et 0,8 Gy (la  $d_{\text{HFDmax}}$  la plus fréquente est 0,2 Gy) correspondant à un effet biologique équivalent à une dose 5 à 10 fois plus élevée<sup>383,390</sup>. De plus,  $d_{\text{HFDmax}}$  peut également varier en fonction du débit de dose<sup>390</sup>. Une étude récente renforce le fait que la HFD est dépendante de la radiosensibilité individuelle et pourrait être liée à la protéine ATM<sup>391</sup>. Plus intéressant encore, et de manière similaire à la réponse adaptative, la HFD a été généralement observée dans des cellules présentant une radiosensibilité intermédiaire et pas dans des cellules radiorésistantes, ni dans des cellules hyperradiosensibles<sup>330,348,392</sup>. De plus, la  $d_{\text{HFD}}$  est du même ordre que les gammes de dose  $d_{\text{RA}}$  décrites précédemment, mais légèrement supérieures ( $d_{\text{RA}} \leq d_{\text{HFD}}$ ). Ryan et coll. ont signalé que, sur 7 lignées de cellules tumorales humaines testées, 4 ont été positives à la fois pour la RA et la HFD. De plus, dans le même rapport, les trois autres lignées cellulaires étaient radiorésistantes et HFD négatives, mais présentaient une RA avec des valeurs  $D_{\text{RA}}$  élevées, ce qui suggère que les cellules peuvent être RA positives sans être nécessairement HFD positives<sup>348</sup>.

**En conclusion, au début de ma thèse, les phénomènes spécifiques aux faibles doses tels que l'hormésis, la RA et la HFD restaient encore mal définis et mal compris. Pourtant ils pouvaient concerner des doses d'exposition scanographique. Il apparaissait donc nécessaire d'en tenir compte dans la caractérisation radiobiologique de l'exposition en scanographie.**

## **2.4.8 Caractérisation radiobiologique de l'exposition scanographique**

Comme on l'a vu auparavant, l'augmentation de l'utilisation de la scanographie et la préoccupation qu'engendre les niveaux de doses distribuées<sup>65</sup> a encouragé les épidémiologistes à s'intéresser à ce domaine. Cependant, la portée des résultats obtenus a été limitée par de nombreux biais<sup>23</sup> et il est devenu essentiel de mieux comprendre les phénomènes biologiques impliqués lors de ces expositions<sup>30,31</sup>. L'évolution des techniques biologiques et la sensibilité accrue de ces dernières a rendu possible les observations dans la gamme des doses faibles, concernant particulièrement les scanners<sup>393</sup>. Plusieurs auteurs se sont intéressés au sujet, notamment au niveau de l'induction des cassures double-brin.

### **2.4.8.1 Étude des CDB après exposition scanographique**

Environ 70% des études ont utilisé le marquage  $\gamma$ H2AX<sup>394-410</sup> car cette technique est l'une des plus sensibles<sup>393,406,411</sup>.

La majorité des travaux en scanographie a consisté à mesurer le taux de foci  $\gamma$ H2AX avant et dans un temps court après l'exposition. Seulement trois publications ont réalisé une cinétique ou un suivi à plus long terme de l'évolution des cassures induites<sup>396,406,410</sup>. Or, la réponse aux radiations dépend non seulement de l'induction des CDB mais surtout de leur réparation<sup>122</sup>. Il existe cependant une grande variabilité dans les protocoles utilisés<sup>393,412-414</sup> et certains auteurs ont quantifié le niveau de  $\gamma$ H2AX en cytométrie en flux<sup>394,398</sup>. Même si cela permet une analyse rapide d'un grand nombre de cellules, l'erreur-type de la moyenne atteint souvent plus de 20 %<sup>393</sup>. De plus, par rapport à l'analyse microscopique classique par immunofluorescence, la quantification du nombre et de la taille des foci par cellule n'est pas possible par cytométrie.

### **2.4.8.2 Étude des chromosomes**

La fréquence des aberrations chromosomiques a été directement liée au risque de cancer dans une vaste étude épidémiologique regroupant 22358 sujets de 11 pays<sup>415</sup>. Certains groupes de travail se sont donc intéressés à l'effet des expositions scanographiques sur ces aberrations et notamment les chromosomes dicentriques

(chromosomes avec deux centromères)<sup>407,416–420</sup>. Cette technique qui est le « gold standard » de la bio-dosimétrie offre en effet des indications à plus long terme que la quantification des foci  $\gamma$ H2AX<sup>393</sup>, même si sa sensibilité est moindre et qu'elle nécessite l'analyse d'un grand nombre de cellules<sup>393,407,413</sup>. Une augmentation des chromosomes dicentriques a été montrée dans plusieurs cas<sup>407,416–419</sup>. En revanche aucune différence n'a été montrée pour les translocations chromosomiques<sup>420</sup>.

#### **2.4.8.3 Étude des micronoyaux**

Une augmentation significative des micronoyaux a été rapportée dans les lymphocytes de patients ayant reçu un scanner<sup>418,421</sup>. La quantification des micronoyaux demeure un outil de biodosimétrie important pour l'exposition aux rayonnements et une alternative potentielle aux chromosomes dicentriques car elle nécessite moins de temps pour l'évaluation des résultats et l'expertise cytogénétique. Néanmoins, la sensibilité de ce test est moindre que les deux techniques décrites auparavant.

#### **2.4.8.4 Influence du modèle cellulaire**

La totalité des études radiobiologiques réalisées sur le scanner ont utilisé des échantillons de sang prélevés sur des patients<sup>394–410,416–420</sup>. Il a été montré que la réponse aux radiations peut être différente selon le type cellulaire, notamment au niveau de la reconnaissance et de la réparation des CDB, selon le type cellulaire utilisé chez un même patient<sup>406</sup> et selon la localisation des cellules exposées dans le corps lors d'un même examen<sup>404</sup>. Cette sensibilité inter-tissulaire et localisation-spécifique en fonction de l'examen réalisé n'a jamais été étudiée en scanographie et des données sur ce sujet seraient utiles dans le but d'avoir une estimation du risque pour chaque type d'indication.

#### **2.4.8.5 Influence de la dose et du protocole d'irradiation**

La plupart des travaux cités auparavant ont montré une proportionnalité des effets biologiques avec la dose, peu importe l'indicateur utilisé (CTDI, PDL, SSDE, Dose absorbée, Dose efficace). À l'exception de la dose absorbée, ces indicateurs ne sont pas spécifiques de la dose reçue par les cellules analysées. De plus, étant donné que

la large majorité des études ont utilisé des échantillons de sang, les doses absorbées restent des estimations effectuées à partir de calcul et simulation Monte Carlo<sup>402</sup>.

Il existe une grande variabilité des protocoles appliqués selon l'indication, la zone explorée et le patient<sup>59</sup> et les paramètres du scanner peuvent influencer la réponse biologique comme par exemple le pitch<sup>400,405</sup>. D'autres part, le nombre d'hélices effectuées n'est quasiment jamais précisé pour les doses en PDL total des examens et pourraient également avoir un impact considérant l'effet des répétitions de doses comme le suggère Khan et al<sup>398</sup> qui montre un taux de  $\gamma$ H2AX plus élevé pour les scanners répétés. En dépit des recommandations de la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) qui suggèrent de ne considérer que les effets additifs lors de ces répétitions de doses, on observe clairement un effet différentiel important du fractionnement qui serait notamment lié à la radiosensibilité individuelle<sup>28,422</sup>.

Pour interpréter les données disponibles jusqu'à maintenant, il est donc très important d'avoir une information précise de la dose et du type de protocole utilisé pour chaque patient.

#### **2.4.8.6 Influence de l'énergie**

L'effet biologique relatif (EBR) des radiations peut être impacté par l'énergie des rayonnements utilisés. Les scanners sont généralement utilisés à des énergies de 100 à 120 kV, ce qui correspond à un EBR de 1<sup>423</sup>. En revanche la question peut se poser lors de l'utilisation de scanner double-énergie. A notre connaissance, une seule étude radiobiologique existe à ce sujet et aucun effet délétère n'est pas démontré<sup>403</sup>.

#### **2.4.8.7 Impact de la radiosensibilité individuelle**

Il n'existe pas d'étude spécifique sur le facteur individuel en scanographie. Pourtant certaines publications montrent clairement des différences de réponse selon les patients<sup>403,406,408</sup>. En effet, Beels et al 2012<sup>408</sup> montrent que pour une même dose, le taux d'induction  $\gamma$ H2AX par cellule varie d'un échantillon à l'autre. Shu min tao et al<sup>403</sup> montrent également une différence de CDB spontanées et induites entre les différents patients. Enfin, Lobjich et al<sup>406</sup> fait état d'un nombre de foci  $\gamma$ H2AX par cellule beaucoup plus élevé chez un patient ayant eu auparavant une réaction suraigüe en

radiothérapie notamment au niveau du taux résiduel de CDB restant non-réparées à 24 h. En fait, la question de la réponse individuelle en scanner s'est surtout focalisée sur la plus grande radiosensibilité supposée des enfants : les études n'ont pas montré de différence significative en fonction de l'âge du patient que ce soit au niveau des CDB<sup>396,398,424</sup>, ou des chromosomes dicentriques<sup>396,417</sup>. Il semblerait donc que la différence de radiosensibilité inter-individuelle soit plus importante et plus facilement détectable que la différence potentielle de radiosensibilité âge-dépendante observée spécifiquement avec la technique de  $\gamma$ H2AX<sup>393</sup>.

## **2.4.8.8 Influence du produit de contraste**

### **2.4.8.8.1 Un peu d'histoire**

Les produits de contraste iodés (PCI) sont largement utilisés pour améliorer la qualité de l'image et le contenu de l'information dans les examens radiologiques, en particulier en scanographie<sup>425</sup>. Les principes de l'augmentation du contraste sont nés avec la radiologie. Avant même la première explication de l'effet photoélectrique par Einstein en 1905, un certain nombre de radiologues ont mis au point d'étranges recettes pour rendre radio-opaques les organes à étudier. A Vienne, en Autriche, en janvier 1896 (c'est-à-dire quelques semaines après la découverte des Roentgen), Eduard Haschek et Otto Theodor Lindenthal<sup>426</sup> ont injecté un mélange de chaux, de cinabre (mercure) et d'huile de pétrole dans la main amputée d'une vieille femme et ont observé les vaisseaux par radiographie. On a considéré qu'il s'agissait de la première angiographie. À Lyon, en France, en novembre 1896, Étienne Destot et Léon Bérard ont appliqué des solutions contenant de la poudre d'or ou de bronze pour visualiser le cerveau et le système vasculaire thyroïdien<sup>427</sup>. D'autres métaux tels que le baryum, le plomb et le bismuth étaient également utilisés dans le même but<sup>428</sup>. Ainsi, les radiologues ont intuitivement favorisé l'utilisation d'éléments lourds comme produits de contraste alors que l'iode n'a jamais été cité avant les années 1920.

Découvert en 1811, l'iode a été proposé en 1831 par Jean Guillaume Auguste Lugol pour le traitement de la syphilis comme mélange d'iode et d'iodure de potassium par Jean Guillaume Auguste Lugol en 1831. Cependant, c'est William Wallace à Dublin qui a le plus contribué au développement de la thérapie iodée contre la syphilis<sup>429</sup>. Alors que l'effet curatif direct de l'iode sur la syphilis est toujours débattu, l'application

intensive de la thérapie à l'iode dans les années 1920, combinée avec des observations radiographiques de routine, a conduit à la conclusion empirique que l'urine dans la vessie devient radio-opaque chez les patients traités à l'iodure de sodium. L'iode a donc été considéré comme un produit de contraste prometteur<sup>430</sup>. Cependant, l'iodure de sodium était trop toxique et était éliminé trop lentement<sup>430</sup>. Composé de benzène incorporant des atomes d'iode, les premiers PCI ont été le lipiodol<sup>430</sup> et l'uroselectan, ce qui a conduit aux premiers urogrammes intraveineux<sup>431</sup>. Des réactions anaphylactiques ont été signalées très tôt et une course féroce pour développer un PCI plus sûr a commencé au milieu des années 1920<sup>432</sup>.

Ainsi, l'utilisation de l'iode pour améliorer le contraste lors des examens radiologiques n'a pas été guidée par une approche documentée et logique mais plutôt par des observations empiriques. Il est intéressant de noter qu'à ce jour, les propriétés atomiques de l'iode sont évoquées a posteriori pour mieux expliquer le choix des PCI dans la pratique de la scanographie. Notamment, il est avancé que puisque les tubes à rayons X les plus fréquemment utilisés en scanner délivrent un spectre de rayons X polychromatique de 100-140 kVp qui inclut des énergies de 30-40 keV, il peut déclencher la photoactivation de l'iode dont l'énergie de couche K est à 33,20 keV. Une telle affirmation ne résiste pas à une analyse quantitative et rigoureuse des données physiques. En effet, le spectre typique des rayons X pour la tomodensitométrie est composé d'une courbe de type poissonnien de 20 à 80, 100 ou 120 keV avec un maximum autour de 50 keV. Cependant, à cette énergie, l'intensité relative d'émission des rayons X ne dépasse jamais 20 %. L'énergie de couche K de l'iode des rayons X à 33 keV représentant environ 10% des rayons X émis ne peut pas expliquer quantitativement l'augmentation du contraste observée avec les PCI (figure 31).

#### **2.4.8.8.2 Quand l'iode rencontre le tungstène**

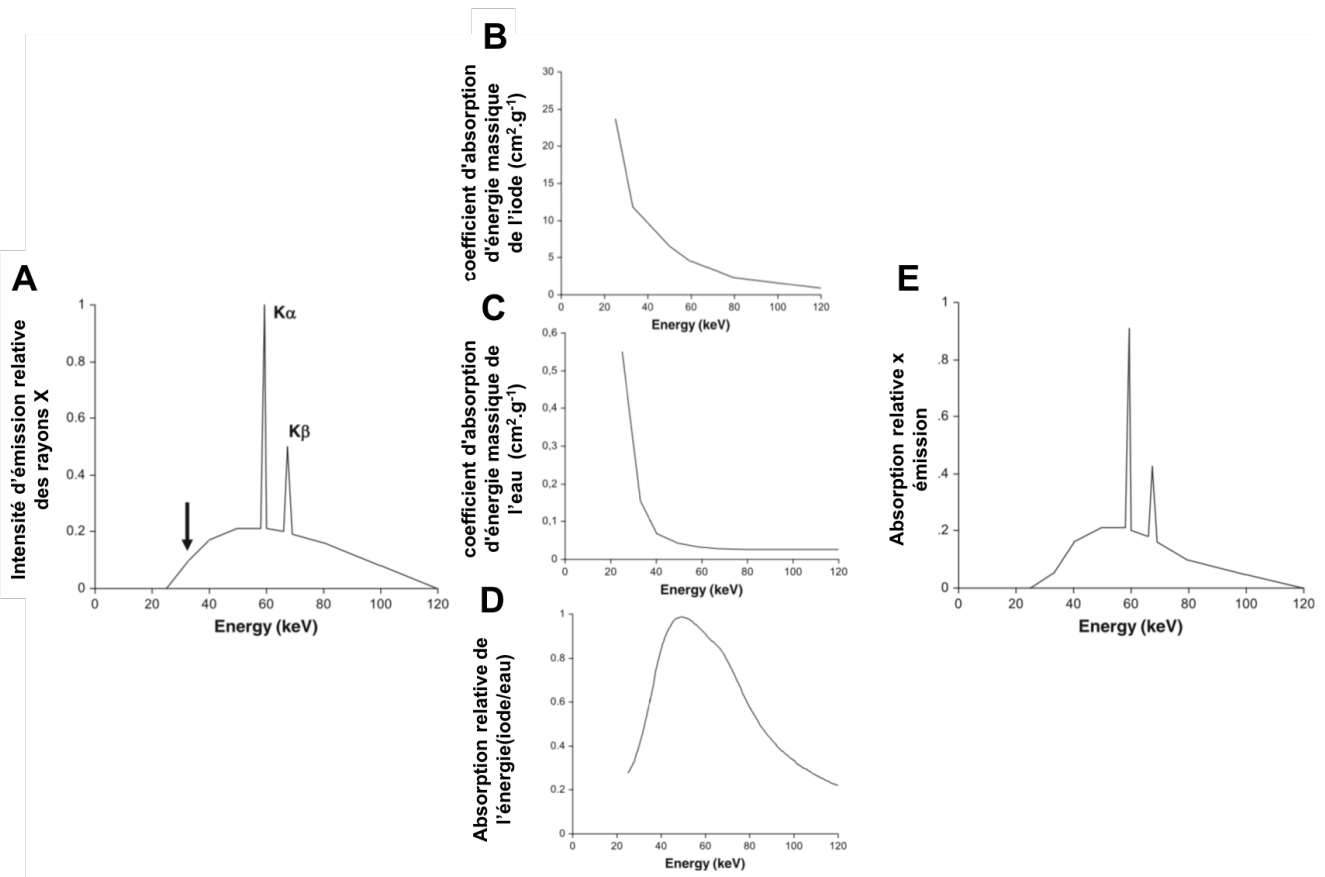
En plus du large spectre de rayons X polychromatiques évoqué ci-dessus, on observe deux pics majeurs de rayons X, tous deux liés à l'élément qui compose les anodes des tubes : le tungstène (figure 31). D'abord choisi par Franz Hanaman et Alexander Just en 1904 pour la lampe à incandescence en raison de son point de fusion élevé et de sa ductilité, le tungstène a été introduit dans l'anode des tubes à rayons X par Coolidge en 1906. Les énergies  $K\alpha$  et  $K\beta$  du tungstène sont respectivement de 59,30 et 67,23

keV. Alors que l'émission relative de rayons X à 67,23 keV est inférieure à 50%, elle est maximale (100%) à 59,30 keV, soit dix fois plus qu'à 33 keV (figure 31). Cette gamme de rayons X d'environ 60 keV fait que les tubes à rayons X avec une anode en tungstène sont particulièrement adaptés à la scanographie. Pour la mammographie, pour laquelle les rayons X n'ont pas besoin d'être plus pénétrants, l'anode est généralement en molybdène ou en rhodium et ses deux énergies  $K\alpha$  et  $K\beta$  sont respectivement de 17,5 et 19,6 keV, et de 20,3 et 22,7 keV.

L'énergie monochromatique la plus intense émise par les tubes à rayons X polychromatiques est de 59,3 keV serait restée un simple détail si cette énergie ne correspondait pas aussi à l'absorption maximale d'énergie des atomes d'iode dans l'eau. En fait, en ce qui concerne l'amélioration du contraste par les PCI, deux points majeurs doivent être considérés :

- L'énergie K des atomes d'iode à 33.20 keV correspond à l'effet photoélectrique maximal
- Comme les PCI sont injectés dans des tissus biologiques, l'absorption d'énergie dans l'eau doit être prise en compte.

Le rapport maximal entre les coefficients d'absorption d'énergie relatifs de l'iode et de la masse d'eau  $\mu$  est atteint dans la gamme d'énergie de 40-60 keV. Par conséquent, à 59.30 keV, le contraste obtenu avec des PCI est maximal. Une telle propriété est donc directement due à la composition de l'anode du tube à rayons X en tungstène. Un autre élément composant l'anode changerait radicalement l'efficacité des PCI (figure 31).



**Figure 31 :** Représentation schématique des spectres d'émission et d'absorption des rayons X liés à l'utilisation d'agent de produit de contraste pendant une séance de scanographie. **A** Spectre d'émission relative des rayons X d'un scanner typique à 120 kVp. La flèche indique la composante de 33,2 keV du spectre qui correspondrait au K edge de l'iode. Coefficients d'énergie massique de l'iode **B** et de l'eau **C** coefficient d'énergie massique  $\mu_{en}/\rho$  exprimés en  $\text{cm}^2.\text{g}^{-1}$  en fonction de l'énergie. **D** Absorption relative d'énergie de l'iode dans l'eau (rapport normalisé entre les coefficients d'absorption d'énergie massique de l'iode et de l'eau  $\mu_{en}/\rho$ ) en fonction de l'énergie. **E** Produit de l'intensité d'émission relative d'un tube à rayons X typique de 120 kVp et de l'absorption relative des rayons X par les ACI

#### 2.4.8.8.3 Les bons et les mauvais côtés d'une coïncidence

Le phénomène de contraste correspond à une absorption locale d'énergie maximale, c'est-à-dire à une dose locale plus élevée. Amato et al<sup>433</sup> ont montré une augmentation de la dose de rayonnement dans tous les organes étudiés à partir du changement d'atténuation mesuré en unités Hounsfield : + 19 % pour le foie, +71 % pour les reins, +33 % pour la rate et le pancréas, et +41 % pour la thyroïde. De plus l'utilisation de



PCI nécessite souvent plusieurs acquisitions stationnaires afin de vérifier la prise de contraste ainsi qu'une image préalable sans injection pour comparaison<sup>59</sup>. Ce surplus de doses devrait être considéré lors de l'optimisation des protocoles<sup>433</sup>.

Bien que ce phénomène soit utile pour le diagnostic, une telle absorption d'énergie excessive peut être responsable d'effets moléculaires et cellulaires spécifiques. Plusieurs auteurs se sont penchés sur l'effet des produits de contraste utilisés en scanographie, notamment à travers l'induction et la réparation des CDB à l'aide du marquage  $\gamma$ H2AX<sup>408,434-440</sup>. Ces travaux ne montrent pas d'effet direct du produit de contraste s'il est injecté après l'irradiation ce qui ne remet pas en cause l'innocuité du produit lui-même. En revanche, s'il est injecté avant l'irradiation, une augmentation des CDB induites de 30 à 149% a été montrée<sup>403,434-436,438-440</sup>. Cet excès de cassures semble être proportionnel à la concentration de PCI<sup>434</sup>. La conséquence pratique de cet excès de CDB (qui correspond à un excès de dose biologique) suggère que la connaissance de la dose physique, qu'elle soit évaluée ou calculée par des méthodes standard, n'est pas suffisante pour mieux estimer les risques associés lorsque des PCI sont présents. Cependant, comme évoqué dans des paragraphes précédents, la réponse biologique aux irradiations semble dépendre de l'induction des CDB mais surtout de leur réparation. Or, les études ayant réalisées des cinétiques ne sont pas forcément celles qui ont analysé le plus d'échantillons<sup>436,439</sup> et ne semblent pas montrer de différence à long terme entre les échantillons avec ou sans PCI.

En 2005, notre laboratoire a démontré que les PCI pouvaient être photo-dégradés (par radiolyse) aux énergies utilisées pour les scanners et générer des ions Iode libres. Ces ions I<sup>-</sup> peuvent s'associer rapidement au potassium ou au sodium organique pour donner de l'iodure de sodium (NaI) ou de potassium (KI)<sup>441</sup>. En fait, comme les molécules de PCI, les molécules NaI et KI entrent facilement dans le cytoplasme et le noyau de la cellule, où ils peuvent interagir avec l'ADN. La production dose-dépendante d'iodures à partir de PCI inhibe la réparation des CDB en diminuant l'activité de la protéine kinase DNA-PK, une étape importante de signalisation nécessaire pour une réponse normale à la radiation. En parallèle, cette inhibition peut favoriser les voies de réparation des CDB sujettes aux erreurs, ce qui peut augmenter l'instabilité génomique et le risque de cancer<sup>441</sup>.

#### 2.4.8.8.4 Influence de la radiosensibilité individuelle

À ce jour, il y a de plus en plus de preuves que les CDB non réparées sont responsables de la létalité cellulaire et de la radiosensibilité des tissus et que les CDB mal réparées sont liées à la stabilité génomique et à la prédisposition au cancer<sup>160</sup>. Dans l'exposition à faible dose des examens scanographiques, on ne s'attend pas à des réactions tissulaires. De plus, les réactions anaphylactiques observées chez certains patients peu après les injections de PCI ne sont pas nécessairement liées aux CDB non réparées<sup>442</sup>. A l'inverse, les CDB mal réparées contribuant à un risque accru de cancer représentent un résultat majeur de l'effet des PCI, même s'il n'y a pas encore de consensus sur les marqueurs spécifiques de CDB mal réparées. De plus, aux doses appliquées lors des examens scanographiques et comme les acquisitions répétées peuvent entraîner l'injection de PCI, les phénomènes de HFD et de répétitions de doses peuvent jouer un rôle et sont liés à la radiosensibilité individuelle<sup>28,383,443,444</sup>. Ainsi, la différence de réponse cellulaire entre individus pourrait à elle seule expliquer la différence entre auteurs<sup>403,408,434–436,438–440</sup>. Par conséquent, l'effet biologique des examens scanographiques avec PCI doit prendre en compte ce facteur individuel et ne dépend pas exclusivement de la dose physique de rayonnement : il ne peut donc pas être évalué uniquement avec la dosimétrie conventionnelle<sup>439,440,445</sup>.

**Bien que l'utilisation des PCI en radiodiagnostic n'ait pas été fondée sur une approche logique mais empirique par étapes<sup>445</sup>, son efficacité pour améliorer le contraste peut entraîner un excès de dose biologique. Les conséquences cliniques d'un tel excès sont susceptibles de dépendre de la concentration de PCI et de la radiosensibilité individuelle. Des études plus poussées qui tiendraient compte de tous ces facteurs pourraient être utiles pour une meilleure estimation du risque potentiel lié aux examens scanographiques en général et avec PCI en particulier<sup>445,446</sup>.**

## 2.5 Apport de la technologie Fibermetrix

Créée en 2014, l'entreprise Fibermetrix, partenaire de cette thèse Cifre, possède une expertise en mesures physiques, en physique de détection des rayonnements, ainsi qu'en optimisation de la dose reçue par les patients et les travailleurs dans le secteur médical et industriel<sup>447,448</sup>. Forte de cette expérience, Fibermetrix développe une technologie de dosimétrie physique basée sur des fibres scintillantes et capable de mesurer en temps réel la dose de rayons X délivrée localement à un patient lors d'un examen d'imagerie médicale. Cette technologie brevetée<sup>449,450</sup> offre une grande sensibilité.

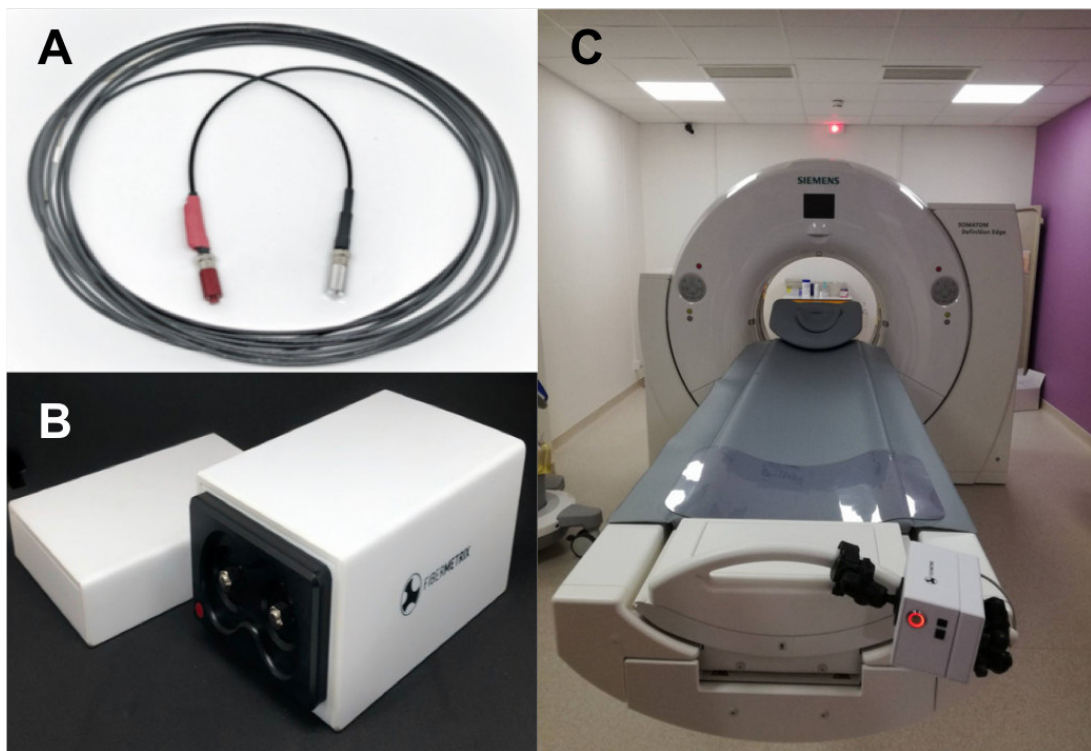
Des études de développement ont été faites pour vérifier la possibilité d'utiliser des fibres scintillantes en dosimétrie scanner<sup>451</sup>. En effet, il a été montré que les fibres scintillantes possèdent une sensibilité et une réponse en énergie tout-à-fait adaptée aux mesures de dose dans la gamme d'énergie du scanner. De plus, un dosimètre à fibre optique scintillante a déjà été utilisé pour mesurer la dose à la peau sur un fantôme anthropomorphe dans le cas d'une radiographie du thorax<sup>452</sup>. Cependant, à ce jour, aucune méthode n'a été développée pour mesurer en temps réel la dose délivrée à un patient dans le cadre d'un examen scanner. Ce type de détecteur présente pourtant de nombreux avantages :

- En raison de sa densité et de sa taille, la sonde ne crée pas d'artefact sur les images et ne risque donc pas de gêner ou biaiser l'analyse du radiologue
- Les plastiques scintillants ont une bonne linéarité sur tout le domaine des rayons X médicaux - L'excellente résolution temporelle permet une mesure en temps réel chaque milliseconde
- Le détecteur est équivalent-eau, et permet donc des mesures de dose plus réaliste pour la dosimétrie des patients que les mesures actuelles

C'est pour ces raisons que Fibermetrix a développé un détecteur à fibre scintillante pour la dosimétrie en scanographie. La fibre scintillante possède un cœur scintillant en polystyrène ainsi que deux couches de revêtements d'indices différents permettant d'améliorer le transport de la lumière dans la fibre (figure 32) avec un diamètre total de 0.5 mm et une longueur de 2 m afin de couvrir toute la table du scanner. A chaque

extrémité de la fibre scintillante se trouve une fibre de transport. Celle-ci n'est pas scintillante, mais permet de guider la lumière avec une perte de signal minimale. L'ensemble, présenté sur la figure 32 est protégée par deux gaines opaques en Hytrel® avec une épaisseur de 0.65 mm permettant de limiter le bruit causé par la lumière ambiante.

La fibre de transport guide la lumière jusqu'à deux photomultiplicateurs situés dans le boîtier du dosimètre (figure 32). Ces photomultiplicateurs sont ensuite reliés à une carte électronique capable de compter le nombre d'impulsions électriques émises par chaque photomultiplicateur, ce qui donne un signal en temps réel directement dépendant du nombre de photons optiques au bout de la fibre, et donc directement dépendant de l'énergie déposée dans la fibre scintillante. Le dispositif dans son ensemble est appelé IVIscan.



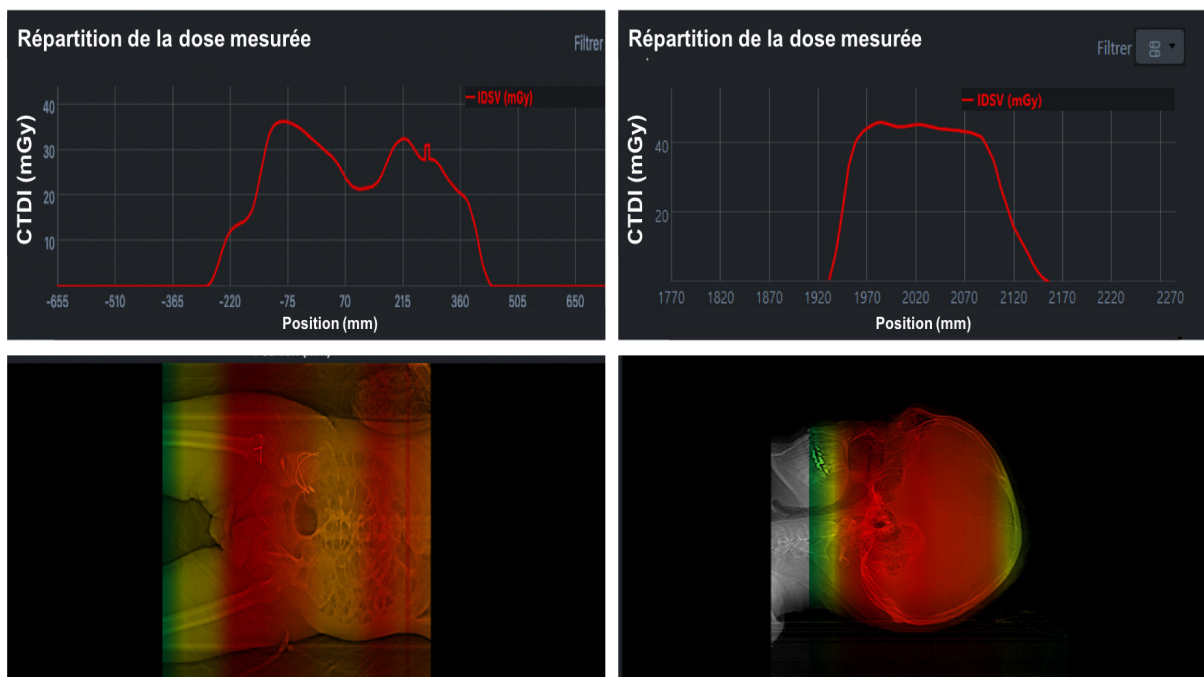
**Figure 32** : Photos du dispositif IVIscan Fibermetrix **A** : Fibre optique scintillante et fibre de transport. **B** : Boîtier du dosimètre **C** : Dispositif IVIscan installé sur le scanner du service de radiologie du Centre Léon Bérard (Lyon. France).

Ce dispositif permet la visualisation de la dose reçue pendant l'acquisition d'un examen patient mais également pour un contrôle-qualité, une maintenance, ou pendant le préchauffage du tube. Cela permet de comparer les doses mesurées avec celles affichées par le scanner (CTDI et PDL) ainsi qu'avec celles réalisées habituellement pour un type d'examen précis.

Le calcul et l'affichage des indicateurs de dose (PDL et CTDI) est actuellement dépendant du scanner et de son constructeur. En effet, même si la Commission Internationale d'Electrotechnique (CIE) donne des recommandations concernant le calibrage des machines et que les organismes internationaux<sup>5</sup> et nationaux<sup>453</sup> uniformisent les méthodes de calcul de ces indicateurs en scanographie, les doses restent des estimations faites à partir de fantômes et peuvent dépendre du constructeur<sup>46,87</sup>.

**La technologie Fibermetrix donne un outil de dosimétrie universel, compatible avec tous les scanners et fournit une dose *mesurée* et non *calculée*.**

D'autres part, le produit dose x longueur définit un CTDI uniforme sur toute la longueur du volume exploré. Or, les dernières technologies de modulation de dose, notamment la modulation automatique du courant du tube, peuvent faire varier le CTDI au cours de l'examen. Là encore, chaque technologie est dépendante du constructeur du scanner<sup>87</sup>. Étant donné que la fibre utilisée dans le dispositif IVIsScan est installée tout le long du lit du patient, une mesure de l'évolution du CTDI de l'examen est possible et donne des informations sur les parties qui sont plus ou moins irradiées grâce à une échelle de couleur comme montré sur la figure 33.



**Figure 33 :** Évolution du CTDI en fonction de la position d'irradiation (en haut) et sa représentation sous forme de cartographie 2D en échelle de couleur (en bas) pour un examen Abdomino Pelvien (à gauche) et pour un examen crâne (à droite).

Ces informations pourraient à terme donner des doses à l'organe calculées à partir de la dose mesurée en calibrant les fibres dans l'eau à la surface et/ou en profondeur.

En plus donc de connaître avec précision la dose, ces nouveaux dosimètres permettent également de connaître l'étalement dans le temps des acquisitions pour toutes les situations d'exposition médicale.

**Ces informations sont d'une importance majeure afin de réaliser des expériences radiobiologiques au plus près de ce qui se fait en clinique et explorer des phénomènes spécifiques tels que l'effet des répétitions de doses. Le dispositif IVISCAN de Fibermetrix était donc l'élément industriel majeur de ma thèse Cifre et, pour la première fois, ont été menées conjointement des mesures de dosimétrie physique et des mesures radiobiologiques.**

### 3 But de la thèse

Au regard de l'augmentation des doses reçues par la population ces dernières années, la connaissance des effets liés aux faibles doses de rayonnement et particulièrement aux expositions scanographiques est devenue un enjeu sociétal majeur.

Ce problème s'avère d'autant plus important que le facteur individuel peut influencer significativement la réponse biologique et clinique aux radiations. Certains patients exposés sont porteurs de mutations de gènes qui codent pour des protéines impliquées dans la signalisation, la réparation des CDB radioinduites et le maintien de l'intégrité du génome.

Aujourd'hui, les données épidémiologiques ne peuvent apporter une quantification suffisante du risque radioinduit. Par ailleurs, très peu d'entre elles n'ont encore considéré l'impact de la radiosensibilité individuelle. En conséquence, l'apport de données radiobiologiques est essentiel.

En parallèle, il apparaît que la variété des protocoles d'irradiation selon les indications, les indicateurs de dose actuels peu pertinent et surtout le manque de sensibilité des dispositifs dosimétriques rendent encore plus difficile une telle quantification du risque.

**Ainsi, dans ce travail de thèse, l'Unité UA8 « Radiations : Défense, Santé, environnement » et la société Fibermetrix ont mis en commun leurs expertises respectives concernant la dose physique et la dose biologique afin de permettre une meilleure évaluation du risque radioinduit chez les patients exposés aux rayonnements ionisants dans le cadre des examens scanographiques.**

A travers ce travail de thèse, notre démarche a été :

- de mieux comprendre les effets spécifiques des faibles doses de rayonnement, notamment les phénomènes HFD, RA et hormésis
- de quantifier les CDB induites dans les différentes conditions d'expositions scanographiques standards avec plusieurs lignées de fibroblastes de patients radiosensibles et/ou radiosusceptibles.

- de prendre également en compte la radiosensibilité inter-tissulaire en quantifiant les CDB induites dans des astrocytes et des cellules épithéliales mammaires pour des scanners du cerveau et du thorax.

Cette quantification des CDB a été réalisée grâce à la technique d'immunofluorescence, fiable et validée pour les faibles doses de rayons X. De plus, afin de vérifier la pertinence du modèle mécanistique basé sur le transit cyto-nucléaire de la protéine kinase ATM, deux biomarqueurs ont été utilisés,  $\gamma$ H2AX et pATM, pour avoir une information sur la reconnaissance et la réparation des CDB.

Enfin, grâce au système de dosimétrie IVIsScan\*, développé par l'entreprise Fibermetrix et installé sur plusieurs scanners dans différents services de radiologie, nous avons pu obtenir des informations cliniques sur les protocoles utilisés. De plus, nous avons mis au point un détecteur ponctuel nous permettant de connaître avec précision et en temps-réel les doses absorbées des cellules exposées.

Le chapitre « Matériels et Méthodes » détaille l'origine des lignées cellulaires et le choix et la mise en place des protocoles scanographiques et expérimentaux utilisés.

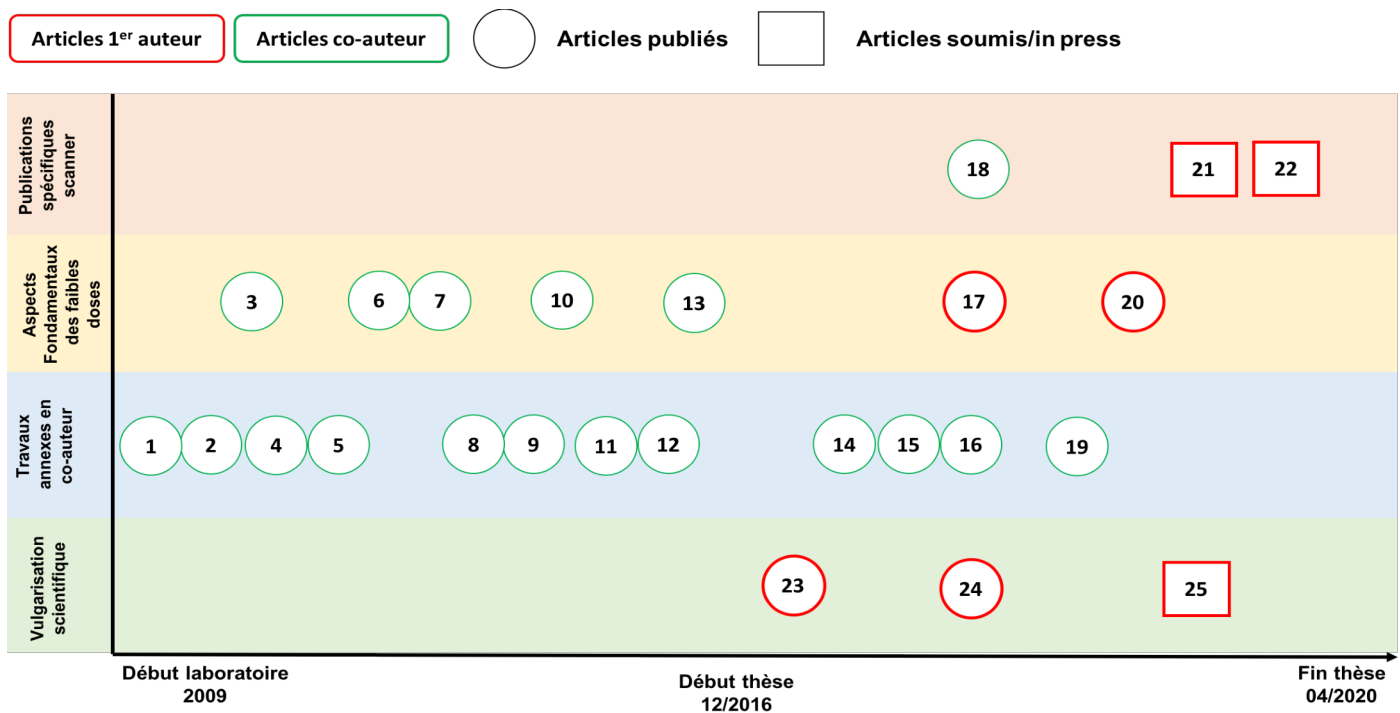
Dans le chapitre « Résultats », nous avons résumé en français chacun des articles sur lesquels cette thèse est basée.

Enfin, dans le chapitre « Discussion », nous avons interprété nos résultats dans leur ensemble et particulièrement l'impact des trois phénomènes spécifiques aux faibles doses à savoir l'HFD, la RA et l'hormésis sur les conséquences biologiques des expositions scanographiques.

Afin de mieux valoriser mes travaux et mon action de recherche, qu'ils soient antérieurs à la thèse ou non, la figure 34 résume le flux d'articles originaux et de revues dans lesquels je suis auteur.

\* *Système de mesure et de monitoring de la dose en scanographie basé sur une technologie de fibres scintillantes*<sup>449,450</sup>





**Figure 34** : représentation des articles publiés depuis mon arrivée au laboratoire en 2009 et depuis le début de mon travail de thèse en décembre 2016. Les articles en 1<sup>er</sup> auteur sont en rouge. La répartition des articles est faite en fonction des thèmes abordés afin de distinguer les articles concernant spécifiquement les faibles doses et la scanographie. J'ai également publié trois articles de vulgarisation scientifique dans le magazine consacré aux professionnels de l'imagerie médicale « Docteur imago ». Certains articles sont « sous press » ou soumis au moment de la rédaction de ce manuscrit (forme carrée).

**1** : Bencokova Z, Pauron L, **Devic C**, Joubert A, Gastaldo J, Massart C, Balosso J, Foray N. Molecular and cellular response of the most extensively used rodent glioma models to radiation and/or cisplatin. J Neurooncol. 2008 Jan;86(1):13-21. Epub 2007 Jul 5.

**2** : 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?]. C R Biol. 2011 Feb;334(2):140-57.

**3** : Granzotto A, **Devic C**, Viau M, Maalouf M, Joubert A, Massart C, Thomas C, Foray N. Individual susceptibility to radiosensitivity and to genomic instability: its impact on low-dose phenomena. Health Phys. 2011 Mar;100(3):282.

**4** : 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 Radiother. 2011 Aug;15(5):348-54.

**5** : Colin C, **Devic C**, Noël A, Rabilloud M, Zabot MT, Pinet-Isaac S, Giraud S, Riche B, Valette PJ, Rodriguez-Lafrasse C, Foray N. DNA double-strand breaks induced by mammographic screening procedures in human mammary epithelial cells. Int J Radiat Biol. 2011 Nov;87(11):1103-12.

- 6** : Colin C, de Vathaire F, Noël A, Charlot M, **Devic C**, Foray N, Valette PJ. Updated relevance of mammographic screening modalities in women previously treated with chest irradiation for Hodgkin disease. *Radiology*. 2012 Dec;265(3):669-76.
- 7** : Thomas C, Martin J, **Devic C**, Bräuer-Krisch E, 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 Oct;89(10):813-22.
- 8** : 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 relocation: towards a mathematical definition of individual radiosensitivity. *J Theor Biol*. 2013 Sep 21;333:135-45.
- 9** : 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.
- 10** : Perez AF, **Devic C**, Colin C, Foray N. [The low doses of radiation: Towards a new reading of the risk assessment]. *Bull Cancer*. 2015 Jun;102(6):527-38.
- 11** : Bachelet JT, Combemale P, **Devic C**, Foray N, Jouanneau E, Breton P. [Management of craniofacial type 1 neurofibromatosis]. *Rev Stomatol Chir Maxillofac Chir Orale*. 2015 Sep;116(4):209-14.
- 12** : 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, Zobot MT, Joubert A, Vincent A, Dalla Venezia N, 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, Baleyrier 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.
- 13** : Viau M, Perez AF, Bodgi L, **Devic C**, Granzotto A, Ferlazzo ML, Bourguignon M, Puisieux A, Lacornerie T, Lartigau É, Lagrange JL, Foray N. [Repeated radiation dose effect and DNA repair: Importance of the individual factor and the time interval between the doses]. *Cancer Radiother*. 2016 May;20(3):217-25.
- 14** : Ferlazzo ML, Bach-Tobdji MKE, Djerad A, Sonzogni L, **Devic C**, Granzotto A, Bodgi L, Bachelet JT, Djefal-Kerrar A, Hennequin C, Foray N. Radiobiological Characterization of Tuberous Sclerosis: a Delay in the Nucleo-Shuttling of ATM May Be Responsible for Radiosensitivity. *Mol Neurobiol*. 2018 Jun;55(6):4973-4983.
- 15** : Pereira S, Bodgi L, Duclos M, Canet A, Ferlazzo ML, **Devic C**, Granzotto A, Deneuve S, Vogin G, Foray N. Fast and Binary Assay for Predicting Radiosensitivity Based on the Theory of ATM Nucleo-Shuttling: Development, Validation, and Performance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2018 Feb 1;100(2):353-360.
- 16** : Pereira S, Bodgi L, Duclos M, Canet A, Ferlazzo ML, **Devic C**, Granzotto A, Deneuve S, Vogin G, Foray N. In Reply to Azria et al. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2018 Jun 1;101(2):491-492.

**17 : Devic C**, Ferlazzo ML, Foray N. Influence of Individual Radiosensitivity on the Adaptive Response Phenomenon: Toward a Mechanistic Explanation Based on the Nucleo-Shuttling of ATM Protein. Dose Response. 2018 Aug 6;16(3):1559325818789836.

**18 : Ferlazzo ML, Devic C**, Granzotto A, Charvet AM, Pilleul F, Colin C, Biston MC, Joubert A, Bourguignon M, Foray N. DNA breaks induced by iodine-containing contrast medium in radiodiagnostics: a problem of tungsten? Eur Radiol Exp. 2018 Aug 15;2:21.

**19 : Maalouf M, Granzotto A, Devic C**, Bodgi L, Ferlazzo M, Peaucelle C, Bajard M, Giraud JY, Balosso J, Hérault J, Biston MC, Malet C, Foray N. Influence of Linear Energy Transfer on the Nucleo-shuttling of the ATM Protein: A Novel Biological Interpretation Relevant for Particles and Radiation. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2019 Mar 1;103(3):709-718.

**20 : Devic C**, Ferlazzo M, Berthel E, Foray N. Influence of individual radiosensitivity on the hormesis phenomenon: towards a mechanistic explanation based on the nucleoshuttling of ATM protein. Dose Response 2020.

**21 : Devic et al (soumis)** Influence of individual radiosensitivity in radiodiagnosis: Biological response to head CT scan exposures

**22 : Devic et al (soumis)** : Influence of individual radiosensitivity in radiodiagnosis: Biological response to chest CT scan exposures

**23 : Docteur imago n°1** : Pourquoi la dose biologique est-elle si différente de la dose physique ? **Devic C**, Foray N, Bourguignon M. Docteur Imago Décembre 2017

**24 : Docteur imago n°2** : Qu'est ce que la réponse adaptative ? Entre vrais effets et fausses interprétations **Devic C**, Foray N. Docteur Imago n° 10 novembre-décembre 2018- janvier 2019

**25 : Docteur imago n°3 (sous presse)** : Hormésis : les faibles doses de radiation sont-elles vraiment bonnes pour notre santé ? Entre mythes et réalité biologique **Devic C**, Foray N.

## 4 Matériels et méthodes

### 4.1 Lignées cellulaires

Comme évoqué dans le paragraphe 2.4.4.1.2, le laboratoire d'accueil a délibérément choisi de n'utiliser que des cellules humaines non transformées de tissus sains. Vingt lignées ont été utilisées afin d'avoir une liste de statuts radiosensibles et/ou radiosusceptibles ainsi que certains tissus spécifiquement exposés lors des examens scanographiques.

Lignée	Type cellulaire	Mutation/maladie connue
<b>100CLB</b>	Fibroblastes	Sujet sain
<b>RACKHAM01</b>	Fibroblastes	Neurofibromatose de type 1
<b>RACKHAM12</b>	Fibroblastes	Neurofibromatose de type 1
<b>RACKHAM39</b>	Fibroblastes	Neurofibromatose de type 1
<b>01HNG</b>	Fibroblastes	Radiosensibilité après RT (projet COPERNIC)
<b>02HNA</b>	Fibroblastes	Radiosensibilité après RT (projet COPERNIC)
<b>13HNG</b>	Fibroblastes	Radiosensibilité après RT (projet COPERNIC)
<b>GM03399</b>	Fibroblastes	Ataxie-télangiectasie hétérozygote possible ATM <sup>+/-</sup>
<b>85MA</b>	Fibroblastes	Syndrome Li-Fraumeni (p53 <sup>+/-</sup> )
<b>Ha</b>	Astrocytes (cortex cérébral)	Sujet sain
<b>Ha-h</b>	Astrocytes (hippocampe)	Sujet sain (même donneur)
<b>Ha-sp</b>	Astrocytes (moelle épinière)	Sujet sain (même donneur)
<b>Ha-bs</b>	Astrocytes (tronc cérébral)	Sujet sain (même donneur)
<b>101CLB</b>	Fibroblastes	BRCA2 <sup>+/-</sup>
<b>102CLB</b>	Fibroblastes	BRCA1 <sup>+/-</sup>
<b>103CLB</b>	Fibroblastes	BRCA1 <sup>+/-</sup>
<b>100CLBepi</b>	Cellules épithéliales mammaires	Sujet sain (même donneur que 100CLB)
<b>101CLBepi</b>	Cellules épithéliales mammaires	BRCA2 <sup>+/-</sup> (même donneur que 101CLB)
<b>102CLBepi</b>	Cellules épithéliales mammaires	BRCA1 <sup>+/-</sup> (même donneur que 102CLB)
<b>103CLBepi</b>	Cellules épithéliales mammaires	BRCA1 <sup>+/-</sup> (même donneur que 103CLB)

**Tableau 9** : tableau récapitulatif des lignées cellulaires utilisées dans ce travail de thèse.

**100CLB** : lignée provenant d'une patiente en bonne santé ayant eu une réduction mammaire. Cette lignée sera considérée comme lignée témoin « radorésistante ».

**Lignée RACKHAM** : ces lignées fibroblastiques proviennent de patients atteints de neurofibromatose de type 1 (NF1). Ce syndrome génétique est associé à une forte prédisposition aux cancers spontanés et radioinduits. De plus, durant l'enfance, ces patients sont fortement exposés en radiodiagnostic à cause des signes cliniques liés à leur maladie<sup>454</sup>.

**Lignées COPERNIC** : lignées COPERNIC provenant de patients ayant montré une radiosensibilité de grade 1-4 pendant ou après leur radiothérapie anticancéreuse (01HNG, 02HNA, 13HNG)<sup>122</sup>.

**GM03399** : Lignée provenant de la « Coriell Institute ». Parents de patients atteints d'ataxie télangiectasie, syndrome le plus radiosensible connu chez l'homme. Ce syndrome est causé par la mutation homozygote du gène ATM, protéine au centre du modèle utilisé dans le laboratoire. Ce syndrome est associé à l'absence de radiosensibilité significative mais à une radiosusceptibilité élevée<sup>156</sup>.

**85MA** : Mutation hétérozygote de p53<sup>+/-</sup>, Syndrome de Li-fraumeni. Ces patients ne présentent pas de radiosensibilité tissulaire significative mais une forte prédisposition aux cancers spontanés et radioinduits<sup>455</sup>.

**HA, HA-h, HA-sp, HA-bs** : Ces lignées, isolées du même donneur, ont été fournies par Sciencell (Carsbad. USA). Elles proviennent de différentes zones cérébrales à savoir le cortex (Ha #1800), l'hippocampe (Ha-h #1830), la moelle épinière (Ha-sp #1820) et le tronc cérébral (Ha-bs #1840). (<https://www.sciencellonline.com/products-services/primary-cells/human/cell-types/astrocytes.html>)

**Lignées 101CLB, 102CLB et 103CLB** : Ces lignées ont été isolées à partir de patientes ayant eu une mastectomie prophylactique. Cette ablation préventive du sein est envisagée en cas de risque important de développement d'un cancer du sein. C'est le cas notamment lors de mutation avérée BRCA2<sup>+/-</sup> (101CLB), ou BRCA1<sup>+/-</sup> (102CLB et 103CLB). À partir de ces prélèvements, nous avons pu isoler des fibroblastes et des cellules épithéliales mammaires (100CLBepi, 101CLBepi, 102CLBepi et 103CLBepi). *La collection cellulaire COPERNIC a été approuvée par le comité d'éthique régional. Tous les patients anonymes ont été informés et ont donné leur consentement signé conformément aux recommandations éthiques. L'échantillonnage a été effectué dans des zones non irradiées*<sup>122</sup>.

## **4.2 Culture cellulaire**

Toutes les cellules étaient systématiquement cultivées en monocouche en flacons T-75 (réf :353136, Falcon) et incubées à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> sans ajout d'antifongique. Toutes les expériences ont été réalisées avec un ensemencement 48h avant irradiation, sur des lamelles de verre stériles, dans des boîtes de pétri de 35mm (réf : 353001, Falcon) à confluence (Majorité en G0/G1) pour éviter les effets du cycle cellulaire.

### **4.2.1 Fibroblastes**

Les fibroblastes ont été cultivés avec le milieu DMEM Glutamax (réf : 31966-021, Gibco, Life technologie) complété par 20 % de sérum fœtal bovin (réf : 10270-106 Gibco, Life technologie), 1% de pénicilline/streptomycine (réf : 15140-122 Gibco, Life technologie). Les cellules ont été trypsinées une fois à confluence (Trypsine EDTA 0.05% réf : 25300-054 Gibco, Life technologie) puis réensemencées ½ en T-75 et ½ en boîte de pétri pour les expositions scanographiques. Toutes les expériences ont été réalisées à des passages inférieurs à 20.

### **4.2.2 Astrocytes**

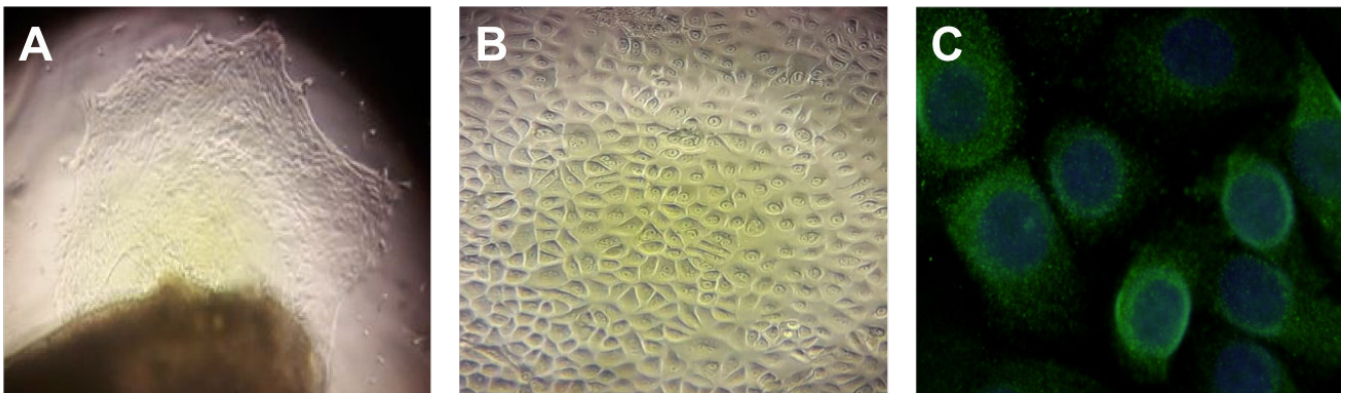
Pour des raisons éthiques évidentes, il était difficile de se procurer des prélèvements pour établir des lignées d'astrocytes. Les astrocytes ont donc été achetés chez un fournisseur (Sciencell) commercialisant ces lignées issus d'avortons. Les cellules ont été cultivées selon les recommandations du fournisseur Sciencell avec le milieu AM (réf : 1801, Sciencell), avec 2% de sérum fœtal bovin (réf : 0010, Sciencell), 1% de pénicilline/streptomycine (réf : 0503, Sciencell), 1% de supplément de croissance astrocytes (réf : AGS 1852, Sciencell) dans des flasques recouvertes de poly-L-lysine (2 µg/cm<sup>2</sup>, réf : 0413, Sciencell). Les cellules ont été trypsinées une fois à confluence (Trypsine EDTA 0.05% réf : 25300-054 Gibco, Life technologie) puis réensemencées ½ en T-75 et ½ en boîte de pétri pour les expositions scanographiques. Toutes les expériences ont été réalisées à des passages inférieurs à 10.

### **4.2.3 Cellules épithéliales mammaires**

Les prélèvements ont été acheminés le jour même au laboratoire à température ambiante. Les fragments biopsiques ont été placés à raison d'un par puits dans une plaque 6 puits, complété de 2 mL de milieu MEpiCM (réf : 7611, Sciencell), 1% de

pénicilline/streptomycine (réf : 0503, Sciencell), 1% de supplément de croissance cellules épithéliales mammaires (réf : MEpiCGS 7652, Sciencell). Après démarrage suffisant de la croissance cellulaire, les cellules ont été repiquées dans des T-25 (figure 35B), puis des T-75 recouvertes de poly-L-lysine (2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , réf : 0413, Sciencell). Les cellules ont été trypsinées une fois à confluence (Trypsine EDTA 0.05% réf : 25300-054 Gibco, Life technologie) puis réensemencées  $\frac{1}{2}$  en T-75 et  $\frac{1}{2}$  en boîte de pétri pour les expositions scanographiques. Toutes les expériences ont été réalisées à des passages inférieurs à 5.

Afin de confirmer la nature des cellules utilisées, une lamelle supplémentaire a été ensemencée afin de réaliser un marquage cytokératine 18 (CK18, Anticorps ab668, dilution 1:100, Abcam) en immunofluorescence. Les cellules épithéliales mammaires luminales possèdent une expression CK18 forte<sup>456</sup> et sont à l'origine d'une écrasante majorité des cancers du sein<sup>457</sup>. Plus de 95% des cellules étaient marquées pour chacune des lignées « epi » (figure 35C) alors que ce même marquage était négatif pour les fibroblastes (données non montrées).



**Figure 35 :** Exemple de culture de cellules épithéliales mammaires avec (A) le démarrage de la croissance cellulaire à partir du prélèvement, puis (B) à confluence en T-25 et (C) le marquage CK18 réalisé ensuite (vert) couplé à la coloration nucléaire DAPI (bleue).

### 4.3 Immunofluorescence :

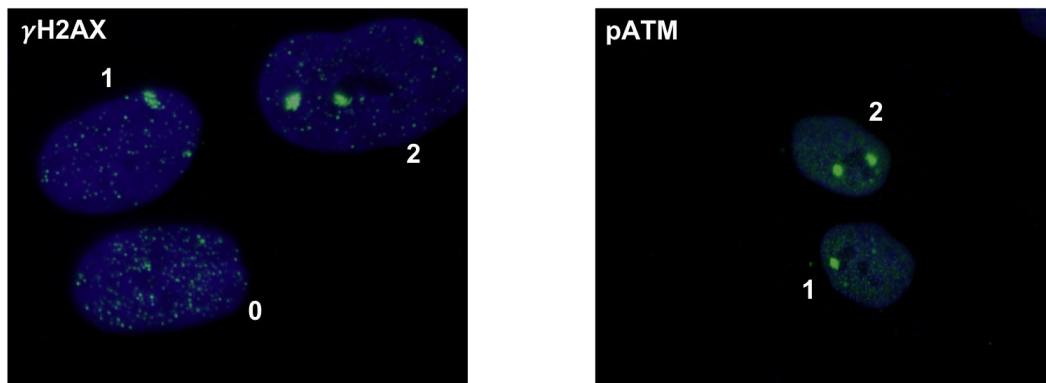
Moins de deux minutes après l'exposition scanographique, les cellules ont été fixées dans une solution de paraformaldéhyde (4%) pendant quinze minutes à température ambiante et ont été perméabilisées ensuite dans une solution de lyse (0,5 % Triton 100X) pendant trois minutes, également à température ambiante. Les anticorps primaires et secondaires ont été respectivement appliqués pendant une heure et trente minutes à 37°C. L'anticorps  $\gamma$ H2AX<sup>ser139</sup> (réf : 05-636, Merck, Millipore, Darmstadt, Allemagne) a été appliqué à une dilution de 1:800. L'anti pATM<sup>ser1981</sup> (réf : 05-740, Merck, Millipore, Darmstadt, Allemagne) a été appliqué à une dilution de 1 :100. L'anticorps secondaire anti-souris fluorescent (FITC, Sigma-Aldrich) a été appliqué à une dilution de 1:100. Les lames ont été montées dans du vectashield 4',6'-diamidino-2-phényl-indole (DAPI) (H-1500 Vector, Life science). Afin d'éviter tout biais dû à la co-immunofluorescence, nous avons délibérément choisi d'appliquer des marquages séparés (une lamelle par anticorps)<sup>160,458</sup>.

### 4.4 Comptage des foci

Les lames ont été examinées avec un microscope à fluorescence Olympus de type BX51 avec un objectif 100X. 100 noyaux ont été analysés pour chacune des trois expériences indépendantes réalisées. Le comptage des foci a été effectué à l'œil nu. La contre-coloration DAPI a également permis l'évaluation indirecte de la proportion de cellules en G0/G1 (noyaux avec contre-coloration DAPI homogène), des cellules S (noyaux présentant une large contre-coloration FITC sans foci  $\gamma$ H2AX), des cellules G2 et des métaphases (noyaux avec coloration DAPI précondensée et condensée et chromosomes visibles). Seules les cellules G0/G1 ont été prises en compte pour la notation des foci  $\gamma$ H2AX.

Pour chaque expérience, les foci  $\gamma$ H2AX et pATM ont été évalués en conditions non irradiées et à 10 min, 1h, 4h et 24 h après irradiation au scanner afin de réaliser des cinétiques de réparation.





**Figure 36** : Exemple de comptage de foci  $\gamma$ H2AX (à gauche) et de foci pATM (à droite) avec les nombres comptés correspondants.

#### 4.5 Traitement des données et statistiques

Les données et les analyses statistiques ont été traitées à l'aide de MATLAB R2016a (MathWorks, Natick, MA). Les tests statistiques ont été réalisés en regroupant les 300 noyaux (100 noyaux comptés par expérience) pour chaque lignée et chaque condition. Un test de Kolmogorov-Smirnov a été effectué pour tester la normalité de la distribution de ces données afin de choisir le test à appliquer<sup>459</sup>. Pour comparer deux conditions entre elles, un test non paramétrique de Mann-Whitney-Wilcoxon a été utilisé<sup>460,461</sup>. Lorsque plus de deux conditions étaient comparées, un test de Kruskal-Wallis a été effectué<sup>462</sup>. Pour chacun des tests, les différences étaient considérées comme statistiquement significatives lorsque la valeur p était inférieure à 0,05. Les barres d'erreurs représentent l'écart type des moyennes des trois expériences indépendantes. Sur les figures, les étoiles dans les conditions non-irradiées et aux temps 10min et 1h post-irradiation correspondent à une différence significative par rapport au témoin radiorésistant. Les étoiles sur les points 24h correspondent à une différence significative par rapport aux conditions non irradiées.

#### 4.6 Expositions cellulaires scanographiques

##### 4.6.1 Protocoles scanner

Étant donné que certaines études épidémiologiques ont évoqué un excès de tumeurs cérébrales<sup>9,15,17</sup> et que l'examen du crâne est l'un des plus fréquents et irradiants si on considère le  $CTDI_{vol}$ <sup>32,59</sup>, nous nous sommes focalisés dans un premier temps sur ce type d'indication. Dans un deuxième temps, nous avons étudié les scanners thoraciques. Cette région anatomique est non seulement exposée lors des examens

du thorax, mais également lors des scanners Thoraco-Abdominal (TA) et Thoraco-Abdomino-Pelvien (TAP). De plus, dans le calcul de la dose efficace, le facteur tissulaire  $W_t$  du sein et le  $W_t$  de l'examen thorax à partir du PDL sont les plus élevés (respectivement 0.12 et 0.015<sup>463</sup>).

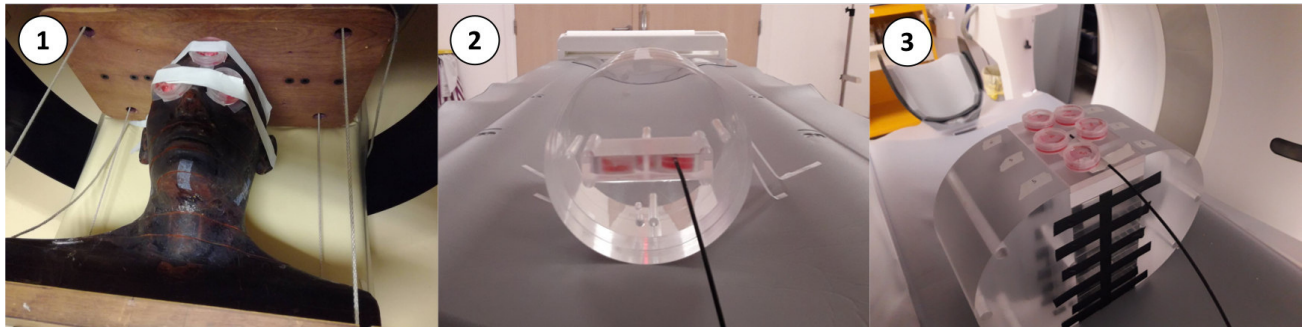
Nous avons utilisé les protocoles scanographiques standards appliqués quotidiennement dans le service de radiologie où ont été réalisés les travaux. Le tableau 10 détaille les caractéristiques de chacun des protocoles.

Protocole	Scanner	mAs	Énergie (kV)	Temps de rotation (sec)	Pitch	Collimation (mm)
Crâne	Somatom definition Edge (Siemens)	166/230	120	1	0.6	3
Thorax	Somatom definition Edge (Siemens)	106/202	100	0.33	1.2	1.5
Topogramme thorax	Somatom definition Edge (Siemens)	35	120			

**Tableau 10 :** Tableau représentant les caractéristiques des protocoles utilisés pour l'exposition des cellules.

#### 4.6.2 Modèles d'exposition scanographique

Nous avons utilisé et fabriqué des fantômes sur mesure, spécifiques de chaque examen et de chaque type cellulaire afin d'être fidèle aux conditions cliniques et aux tissus exposés.



**Figure 37 : Détails des fantômes utilisés pour les expositions cellulaires**

**1** : Le fantôme anthropomorphique de tête nous a été prêté par le service de physique médicale du Centre Léon Bérard. Il a été utilisé pour les expositions des fibroblastes en scanner crâne.

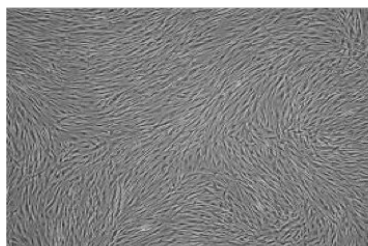
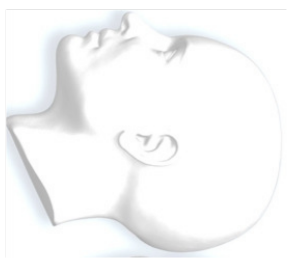
**2** : Fantôme en PMMA de 16cm de diamètre créé sur mesure avec la société Fibermetrix. Ce fantôme a été utilisé pour les expositions des astrocytes en scanner crânien afin de mimer l'atténuation du faisceau de rayon X par la matière.

**3** : Fantôme en PMMA de 32cm de diamètre créé sur mesure avec la société Fibermetrix. Ce fantôme a été utilisé pour les expositions des fibroblastes et des cellules épithéliales mammaires. La forme ovale est plus proche de la forme d'un tronc humain comparé aux fantômes circulaires de 32cm utilisés habituellement.

Le PMMA (de l'anglais polyméthylméthacrylate) est un polymère thermoplastique transparent habituellement utilisé dans la confection des fantômes dosimétriques et dont la densité se rapproche de celle du corps humain. (Densité corps humain :  $1062 \text{ kg/m}^3$  ; Densité PMMA :  $1180 \text{ kg/m}^3$ ).

La dose absorbée a été mesurée grâce à un détecteur ponctuel équipé d'une fibre optique scintillante (partie active de  $500 \mu\text{m}$  de diamètre et de  $3\text{mm}$  de long) développé par la société Fibermetrix<sup>448-450</sup>. Le système a été étalonné en Kerma dans l'air pour les qualités de faisceau du scanner. Cette fibre est notamment présente sur les photos des fantômes 2 et 3. Des mesures ont été effectuées à la surface des fantômes sans boîte de pétri et dans les boîtes de pétri avec le milieu de culture afin de vérifier si le support atténuait la dose. Aucune différence significative n'a été observée.

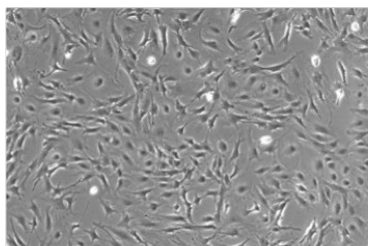
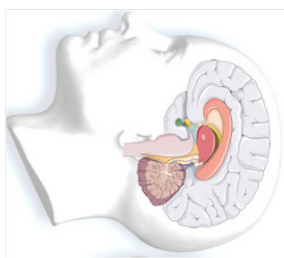
### Scanner crâne



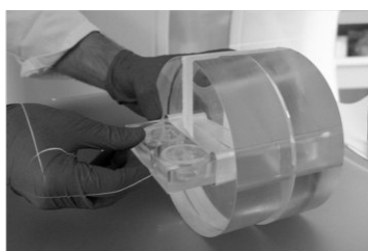
9 lignées de fibroblastes



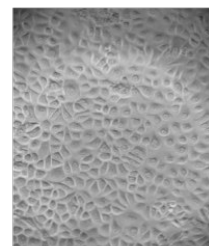
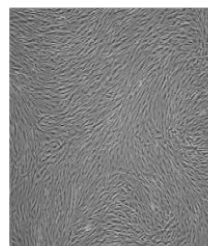
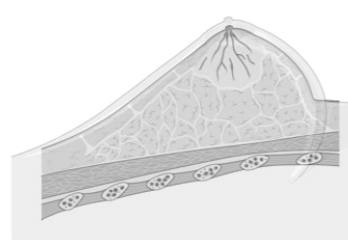
### Scanner crâne



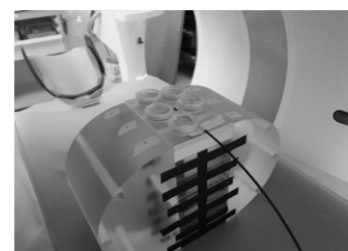
4 lignées d'astrocytes  
1 donneur  
4 localisations cérébrales



### Scanner thorax



9 lignées de fibroblastes  
+ 4 donneuses Fibroblastes  
et cellules épithéliales  
mammaires



**Figure 38** : figure récapitulative des protocoles scanographiques utilisés, des cellules exposées et des fantômes associés.

## 5 Résultats

*Dans ce paragraphe nous présenterons dans un premier temps un résumé des conclusions des deux revues réalisées durant ce travail de thèse<sup>302,303</sup>. Dans un deuxième temps, nous nous focaliserons sur les deux articles expérimentaux concernant les expositions scanographiques cérébrales et thoraciques<sup>464,465</sup>.*

### 5.1 Vers un modèle unifié pour expliquer les phénomènes spécifiques des faibles doses ?

Comme nous l'avons expliqué dans le paragraphe 2.4.6.3, la théorie du modèle de transit d'ATM proposé en 2016 a notamment permis de fournir une prédiction de la radiosensibilité au niveau clinique, une explication mécanistique du pouvoir protecteur de la combinaison statines+bisphosphonates, une interprétation biologique de la formule LQ et une explication de la radiosensibilité de syndromes associés à une mutation de protéines cytoplasmiques<sup>466</sup>. Nous avons donc appliqué cette théorie afin de proposer une explication mécanistique aux trois phénomènes spécifiques des faibles doses : l'HFD, la réponse adaptative et l'hormésis.

#### 5.1.1 L'hypersensibilité aux faibles doses

Le phénomène d'hypersensibilité aux faibles doses (HFD) est une des nombreuses énigmes de la radiobiologie (paragraphe 2.4.7.3). Dans le cadre du modèle de transit d'ATM, lors d'une exposition à une faible dose de radiations, le nombre de monomères ATM produits par l'irradiation dans le cytoplasme est réduit. Ceci est particulièrement vrai dans les cellules radiosensibles du groupe II où est observée l'HFD. Ces cellules sont caractérisées par un retard important du transit d'ATM où peu de monomères sont capables de diffuser dans le noyau, notamment à cause de substrats d'ATM. En conséquence, moins de CDB sont reconnues par la réparation par suture (NHEJ) et resteront non réparées (figure 42). Il a été démontré que si les CDB radioinduites ne sont pas reconnues par la réparation par suture pendant la première heure suivant l'irradiation, elles peuvent être reconnues par la voie de recombinaison non-homologue dépendante de MRE11 et créatrice d'erreurs<sup>466</sup>. L'HFD peut donc entraîner un excès de mort cellulaire dû à des CDB non réparées mais également un excès d'instabilité génomique dû à des CDB mal réparées. Cependant, il est nécessaire de

vérifier cette explication mécanistique de l'HFD par rapport aux autres phénomènes spécifiques des faibles doses<sup>466</sup>.

### 5.1.2 La réponse adaptative

Comme on l'a vu dans le paragraphe 2.4.7.1.1.3, la RA est observable spécifiquement dans les cellules présentant une radiosensibilité intermédiaire. Dans le cadre de la théorie du transit d'ATM, dans le cas de cellules radiorésistantes, le flux d'ATM est amplement suffisant pour que l'effet de  $d_{RA} + \Delta t_{RA}$  soit nul, rendant donc la RA non mesurable. Pour les cellules hyperradiosensibles (pas de transit d'ATM ou ATM non fonctionnel), l'effet de  $d_{RA} + \Delta t_{RA}$  est déjà délétère et donc s'ajoute à celui de  $D_{RA}$  : la RA n'est pas mesurable non plus. Dans le cas de cellules modérément radiosensibles soumises à une  $d_{RA}$  comprise entre 0,001 et 0,5 Gy, la diffusion des monomères d'ATM est environ 2 fois moins importante que dans les cellules radiorésistantes. Par exemple, environ 40 000 et 20 000 monomères d'ATM passent respectivement la membrane nucléaire après 0,2 Gy suivi de 6 heures ( $d_{RA} + \Delta t_{RA}$ ) pour les cellules radiorésistantes et modérément radiosensibles. Toutefois, une dose de 2 Gy ( $D_{RA}$ ) produit en 10 min, pour le même type de cellules respectivement, environ 30 000 et 16 000 monomères d'ATM<sup>302</sup>. Pendant  $\Delta t_{RA}$  les monomères d'ATM produits par  $d_{RA}$  peuvent perdre leur activité en se « redimérisant ». Pourtant, même si environ 20 % de monomères d'ATM apportés par  $d_{RA}$  restent actifs pendant  $\Delta t_{RA}$  (soit environ 4 000 monomères dans notre cas), cet apport représente environ 25 % (4 000 sur 16 000) des monomères d'ATM actifs supplémentaires pour répondre à  $D_{RA}$ . Dans ce cas précis, un  $\Delta t_{AR}$  trop court ne permettrait pas un flux suffisant ; un  $\Delta t_{AR}$  trop long aboutirait à des monomères inactifs. Ainsi, dans les cellules radiosensibles,  $d_{AR} + \Delta t_{AR}$  produirait donc bien une stimulation de la réparation des dommages de l'ADN par un apport supplémentaire de monomères d'ATM. L'intensité de la réponse adaptative dépendrait donc fortement de la radiosensibilité des cellules irradiées.

La réponse adaptative (c'est-à-dire la réduction de l'effet biologique d'une forte dose de radiation par une dose plus faible) est donc bien un phénomène observé de façon expérimentale. Ce n'est pas un artefact. Il survient cependant dans des conditions spécifiques :

1. Un scénario d'exposition de type  $d_{RA} + \Delta t_{RA} + D_{RA}$  doit être appliqué, avec  $d_{RA}$  comprise entre 0,001 et 0,5 Gy,  $\Delta t_{RA}$  entre 2 heures et 24 heures et  $D_{RA}$  entre 0,1 et 5 Gy.

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

### 5.1.3 L'hormésis

Comme on l'a vu dans le paragraphe 2.4.7.1.6, le phénomène d'hormésis, déclenché par une dose unique  $d_{\text{horm}}$  appartenant à la gamme de dose [20-75 mGy], est observé préférentiellement dans les cellules radiorésistantes. La reconnaissance et la réparation des CDB radioinduites est complète pour des doses inférieures ou égales à 2 Gy dans ces cellules<sup>122</sup>. Cependant, elles peuvent présenter une instabilité génomique faible mais significative avec des taux de cassures simple-brin (CSB) spontanées dues aux espèces réactives de l'oxygène ou à une activité de nucléase<sup>467</sup>. Cette activité de nucléase spontanément élevée contribue au vieillissement et à l'instabilité génomique en augmentant les dommages de l'ADN<sup>467,468</sup>. Dans la gamme de doses où est observé l'hormésis, le nombre de CSB radioinduites ne dépasse normalement pas 75 CSB par cellule, ce qui n'est statistiquement pas suffisant pour créer une CDB supplémentaire. En revanche, même s'il y a peu ou pas de CDB

induites, un flux de plusieurs milliers de monomères d'ATM diffusent très vite dans le noyau<sup>303</sup>. Cet apport inattendu de monomères d'ATM pourrait permettre aux cellules de réparer des dommages spontanés (CDB ou CSB). Ainsi, cette « détoxification » des cellules permettrait de réduire les éventuels risques de cancer ou de vieillissement liés à ces dommages. Cet effet ne pourrait pas se produire dans les cellules radiosensibles, notamment celles issues d'individus prédisposés au cancer, puisqu'au contraire,  $d_{\text{horm}}$  produirait directement ou indirectement des CDB liées à l'hyper-recombinaison en plus des dommages spontanés liés à l'environnement qui peuvent être nombreux pour ce type de cellules instables génomiquement. L'apport des monomères d'ATM n'arriverait pas à compenser les dommages supplémentaires induits par  $d_{\text{horm}}$ . Le phénomène d'hormésis aurait donc un sens moléculaire.

Dans le cadre du modèle de transit d'ATM, dans la mesure où les paramètres choisis dépendent de l'activité de la kinase ATM dans le noyau, les conséquences biologiques de l'hormésis peuvent être d'une grande diversité. En effet, la protéine ATM s'est révélée être en amont d'une cascade de phosphorylation de ses substrats en obéissant à une hiérarchie fonctionnelle et temporelle : phosphorylation des substrats ATM impliqués dans la reconnaissance des dommages de l'ADN, puis dans la réparation de ces dommages, puis dans le contrôle du cycle cellulaire et enfin dans les voies de mort cellulaire<sup>469</sup>. Il est intéressant de noter que toutes les étapes de la réponse moléculaire et cellulaire aux radiations sont connues pour être facilitées par une activité nucléaire de la kinase ATM très élevée, ce qui rend notre modèle cohérent avec le phénomène d'hormésis. Les conséquences d'une forte activité d'ATM peuvent également être observées à l'échelle cellulaire en aval. C'est notamment le cas des caractéristiques cliniques qui se produisent à l'échelle des tissus, comme les réactions immunitaires et inflammatoires<sup>469</sup>.

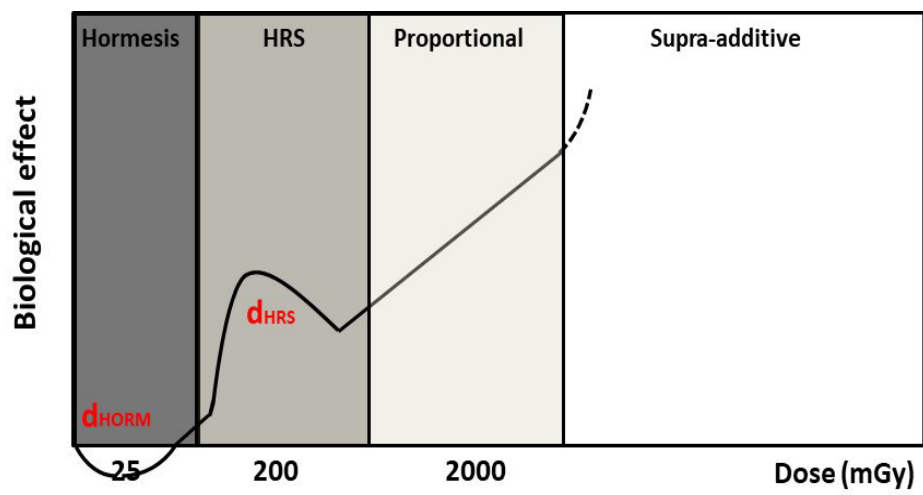
Cependant, des données expérimentales supplémentaires relatives à ATM sont nécessaires pour établir un lien quantitatif et qualitatif entre l'événement cellulaire et les réactions tissulaires. De plus, tous ces paramètres ne peuvent pas décrire un phénomène d'hormésis dans la même mesure. Par exemple, la reconnaissance et la réparation des CDB et des chromosomes sont des notions "limitées" : lorsque toutes les lésions sont reconnues ou réparées, une dose d'hormésis ne peut pas aider à en reconnaître ou à en réparer davantage. Par conséquent, si la reconnaissance ou la



réparation des CDB et des lésions chromosomiques est considérée comme paramètre, la réponse à la dose peut présenter un seuil mais pas une courbe en forme de J et ne peut donc pas révéler l'hormésis comme défini dans l'introduction. L'hormésis peut dépendre de l'activité nucléaire de la kinase ATM et contribuer à réduire la mort cellulaire spontanée, l'instabilité génomique et le vieillissement des cellules radiorésistantes.

#### **5.1.4 Les contributions de l'HFD et de l'hormésis dans le débat sur les effets à faible dose et à faible débit de dose**

Les phénomènes d'HFD et d'hormésis sont respectivement observés dans les cellules radiosensibles et radiorésistantes. Quelles sont les contributions relatives de ces deux phénomènes dans les modèles linéaires sans seuil (LNT) / non linéaires à seuil (NLT) ? Les phénomènes d'hormésis et d'HFD sont respectivement révélés par des courbes en forme de J et de  $\Lambda$ , dépendantes de la dose. À un débit de dose élevé (comme pour les bombardements d'Hiroshima et Nagasaki), l'hormésis et l'HFD se produisent à des gammes de dose distinctes ([20-75 mGy] pour l'hormésis ( $d_{\text{horm}}$ ) et [100-800 mGy] pour l'HFD ( $d_{\text{HFD}}$ ) (figure 39).

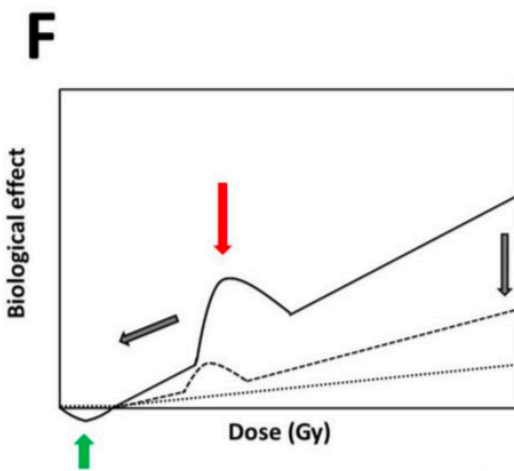
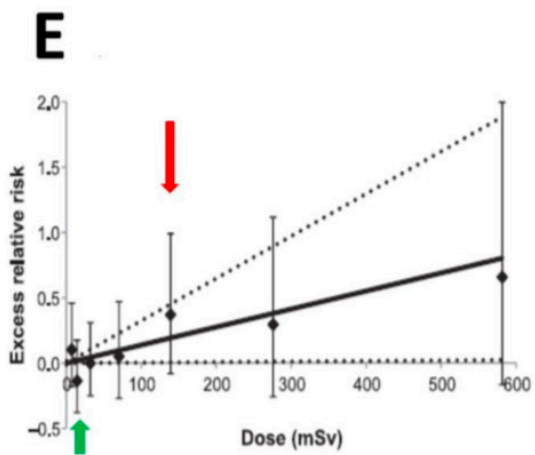
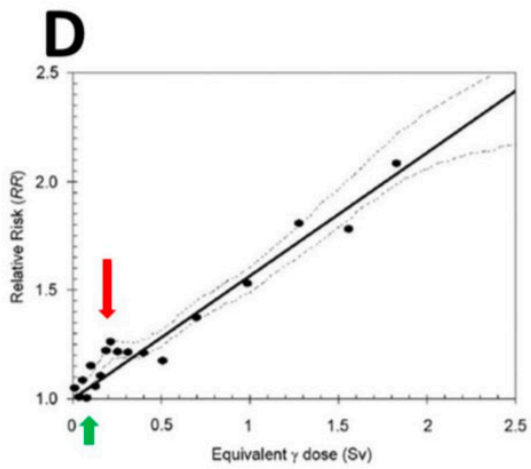
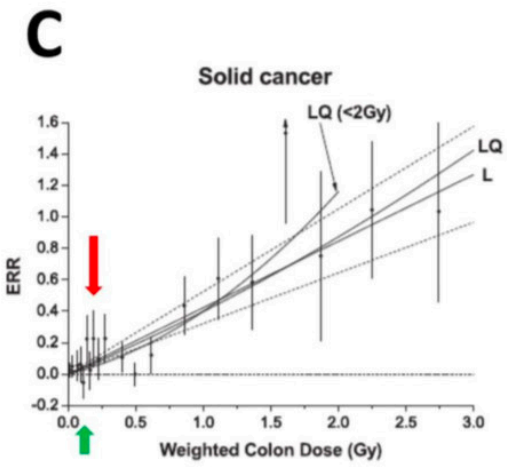
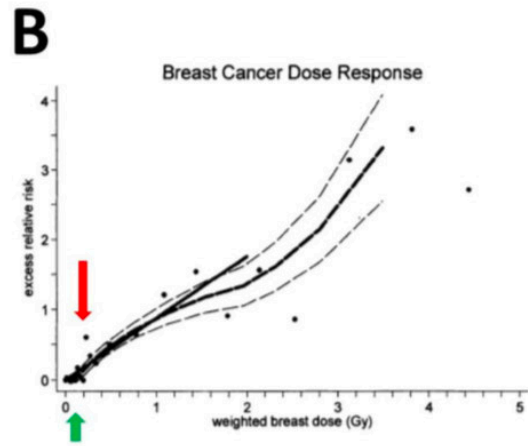
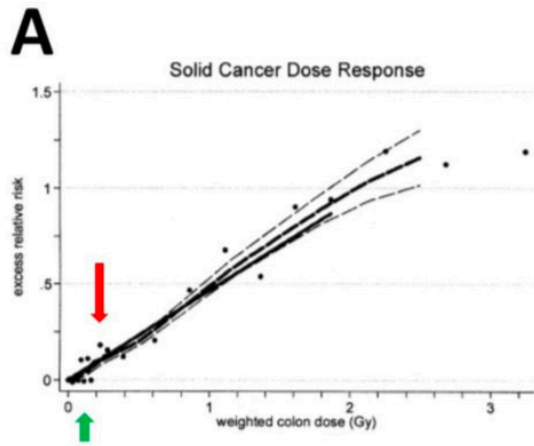


SSB induced per cell:	25	200	2000	
DSB induced per cell:	<1	8	80	
Yield of active ATM monomers				
- in radioresistant cells:	Maximal	Maximal	Reduced	Insufficient
- in radiosensitive cells:	Reduced	Insufficient	Insufficient	Insufficient

**Figure 39 :** Illustration schématique des phénomènes d'HFD et d'hormésis en fonction de la dose. Lorsque l'effet biologique est tracé en fonction de la dose, les phénomènes HFD et d'hormésis sont respectivement révélés par une courbe en forme de J et une courbe en forme de  $\Delta$ . Ces deux phénomènes de faible dose atteignent leur ampleur maximale à des doses différentes,  $d_{HORMmax}$  et  $d_{HFDmax}$ .

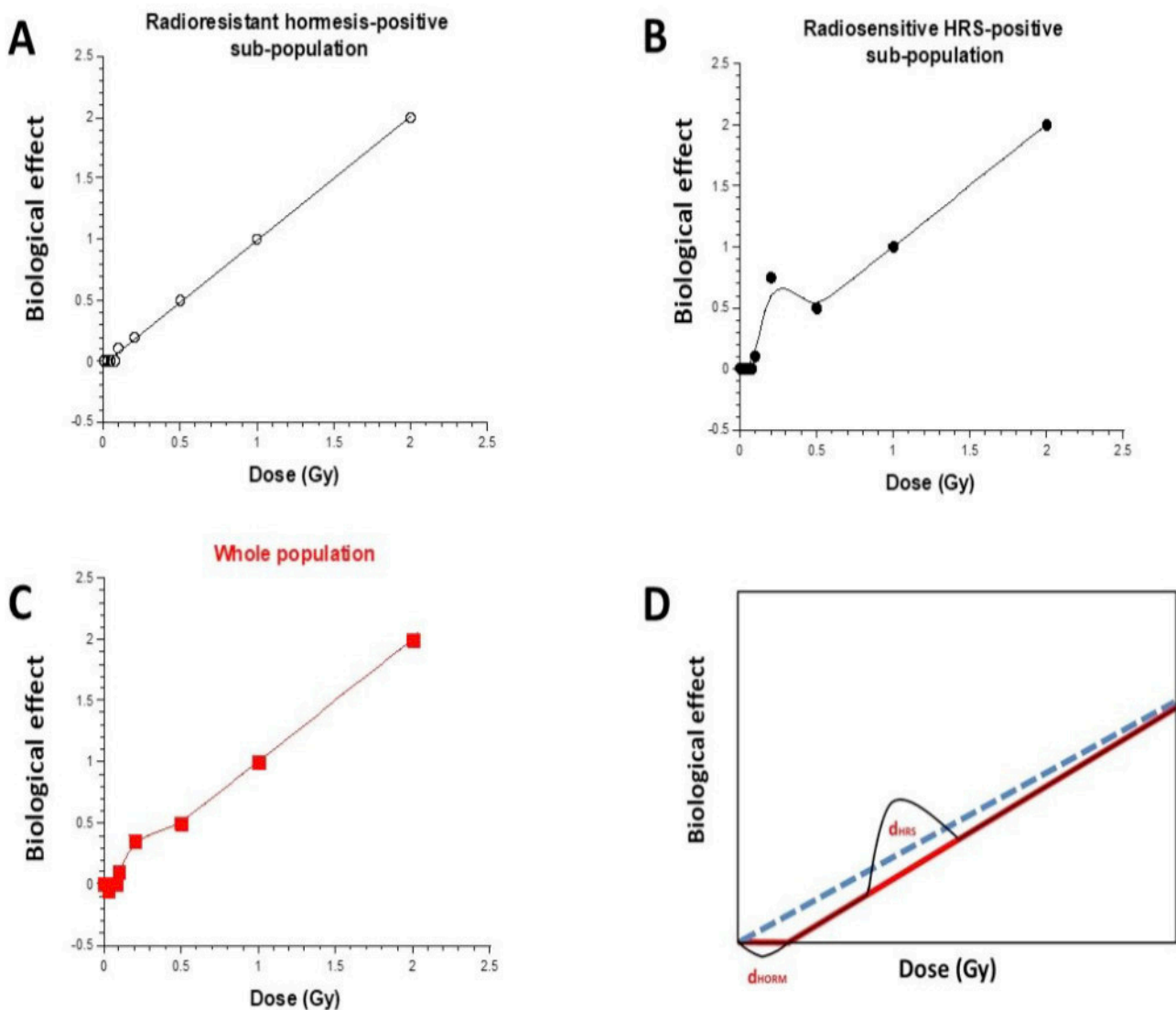
Il existe un certain nombre d'exemples de données montrant que ces deux phénomènes montrent un pic autour de 200 mGy et un pic inversé autour de 25 mGy. C'est notamment le cas du risque relatif de l'incidence des tumeurs solides chez les survivants d'Hiroshima<sup>376,470,471</sup> (figure 40 A-D). Dans les données épidémiologiques obtenues auprès d'individus exposés à des doses plus faibles (comme pour les travailleurs du nucléaire), la pente générale du risque relatif diminue, ce qui correspond à un taux d'induction de CDB plus faible et à un temps plus long alloué à la réparation des dommages de l'ADN<sup>472</sup> (figure 40E). Toutefois, dans ces cas, on constate que le pic reflétant l'HFD est décalé vers des valeurs plus faibles (environ 150 mGy dans l'exemple de la figure 40E). Comment expliquer cette tendance ? Dans un rapport précédent, on a constaté que l'effet HFD maximal correspondait à une durée d'irradiation constante inférieure à 30s, indépendamment de la dose, du débit de dose

et du modèle cellulaire<sup>390</sup>. Par conséquent, plus le débit de dose est faible, plus la dose  $d_{\text{HFD}}$  est faible. À partir de ces hypothèses, nous pouvons donc proposer un modèle général dans lequel le risque diminue avec le débit de dose en même temps que la dose à laquelle l'effet HFD est maximal (figure 40F). Il est intéressant de noter que notre précédent article sur l'HFD prévoit que le  $d_{\text{HFD}}$  est inclus dans gamme [20-75 mGy] pour les débits de dose inférieurs à 0,1 Gy/min<sup>390</sup>. En d'autres termes, l'HFD et l'hormésis peuvent se compenser mutuellement pour des débits de dose inférieurs à 0,1 Gy/min et un seuil horizontal devrait apparaître, ce qui peut rendre plus difficile une discrimination significative des deux phénomènes (figure 41F). Bien que des recherches supplémentaires soient nécessaires pour consolider ce modèle, c'est la première fois à notre connaissance que le débit de dose est inclus dans un modèle de risque dont l'interprétation mécaniste est proposée. Il est à noter que les données disponibles ne permettent pas encore de prédire l'hormésis avec des expositions répétées/chroniques.



**Figure 40** : Exemples représentatifs de courbes dose-effet montrant à la fois les phénomènes d'hormèse et de HFD. **A.** Réponse à la dose de cancer solide chez les survivants de la bombe d'Hiroshima reproduite à partir de la figure 3 de <sup>470</sup> avec autorisation. La ligne continue épaisse est la moyenne linéaire ajustée de l'excès de risque relatif (ERR) à l'âge de 70 ans après exposition à l'âge de 30 ans sur des données dans la gamme de dose de 0 à 2 Gy. Les points sont des estimations non paramétriques de l'ERR dans les catégories de dose. La ligne en pointillés épais est un lissage non paramétrique des estimations spécifiques à la catégorie et les lignes en pointillés fins sont une erreur type au-dessus et au-dessous de ce lissage<sup>470</sup>. **B.** Courbe de réponse à la dose de cancer du sein chez les femmes ayant survécu à la bombe d'Hiroshima et reproduite à partir de la figure 14 de <sup>470</sup> avec autorisation. Mêmes caractéristiques que le panel A<sup>470</sup>. **C.** Courbe de réponse à la dose des cancers solides chez les survivants de la bombe d'Hiroshima reproduite à partir de la figure 4 de <sup>376</sup> avec autorisation. ERR pour tous les cancers solides en relation avec l'exposition aux radiations. Les cercles noirs représentent le TRE et l'IC à 95 % pour les catégories de dose, ainsi que la tendance estimée sur la base de modèles linéaires (L) avec un IC à 95 % (lignes pointillées) et du modèles linéaires-quadratiques (LQ) utilisant la gamme complète des doses, et le modèle LQ pour les données limitées à la dose < 2 Gy. **D.** Courbe de réponse à la dose des cancers solides des survivants de la bombe d'Hiroshima et reproduite à partir de la figure 1 de <sup>473</sup> avec autorisation. Les cancers spécifiques à l'âge ont été évalués sur la période de suivi 1958-1994 par rapport à ceux d'une personne non exposée, moyenné sur la période de suivi, le sexe, et l'âge à l'exposition. Les courbes en pointillés représentent l'erreur-type  $\pm$  pour la courbe lissée. La ligne droite est l'estimation linéaire du risque, calculée à partir de la fourchette 0-2 Sv. En raison de la distinction apparente entre les taux de cancer distal et proximal à dose zéro, la ligne de base unitaire correspond aux survivants à dose zéro situés à 3 km des bombes. La ligne pointillée horizontale représente la ligne de base alternative si les survivants distaux n'ont pas été omis. L'encadré montre les mêmes informations pour la gamme de doses plus complète<sup>473</sup>. **E.** Courbe de réponse à la dose des leucémies de l'étude du registre national britannique des travailleurs du nucléaire, reproduite à partir de la figure 1 de <sup>472</sup> avec autorisation. Estimations du TRE de la leucémie non lymphatique et de la catégorie de dose cumulative externe décalée de deux ans de l'IC à 90 % avec estimation linéaire du TRE/Sv et lignes de référence associées de l'IC à 90 %<sup>472</sup>. **F.** Illustration schématique de la double occurrence de l'hormésis et de l'HFD et de son évolution théorique jusqu'à la diminution du débit de dose (flèches grises). La ligne en pointillé montre les données théoriques pour un débit de dose inférieur à celui indiqué par la ligne pleine. La ligne pointillée correspond aux données théoriques de débit de dose inférieur à 0,1 Gy/min avec lesquelles l'hormésis et le HFD se compensent dans un seuil horizontal. Dans tous les panneaux, les flèches rouges et vertes indiquent respectivement l'effet maximal de l'HFD et de l'hormésis

Nous avons ensuite examiné les conditions d'apparition des phénomènes d'hormésis et d'HFD dans le cadre des modèles LNT/NLT. Il est intéressant de noter qu'en simulant des sous-populations radiosensibles et radiorésistantes, le modèle LNT semble numériquement incompatible avec les phénomènes d'hormésis et de HFD, tandis que les modèles NLT semblent plus permissifs (figure 41). Par conséquent, s'il existe des sous-populations significatives d'individus radiorésistants hormésis-positifs et d'individus radiosensibles HFD-positifs, le NLT peut les prendre en compte dans la mesure où l'erreur statistique est acceptable. Là encore, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour documenter cette hypothèse.

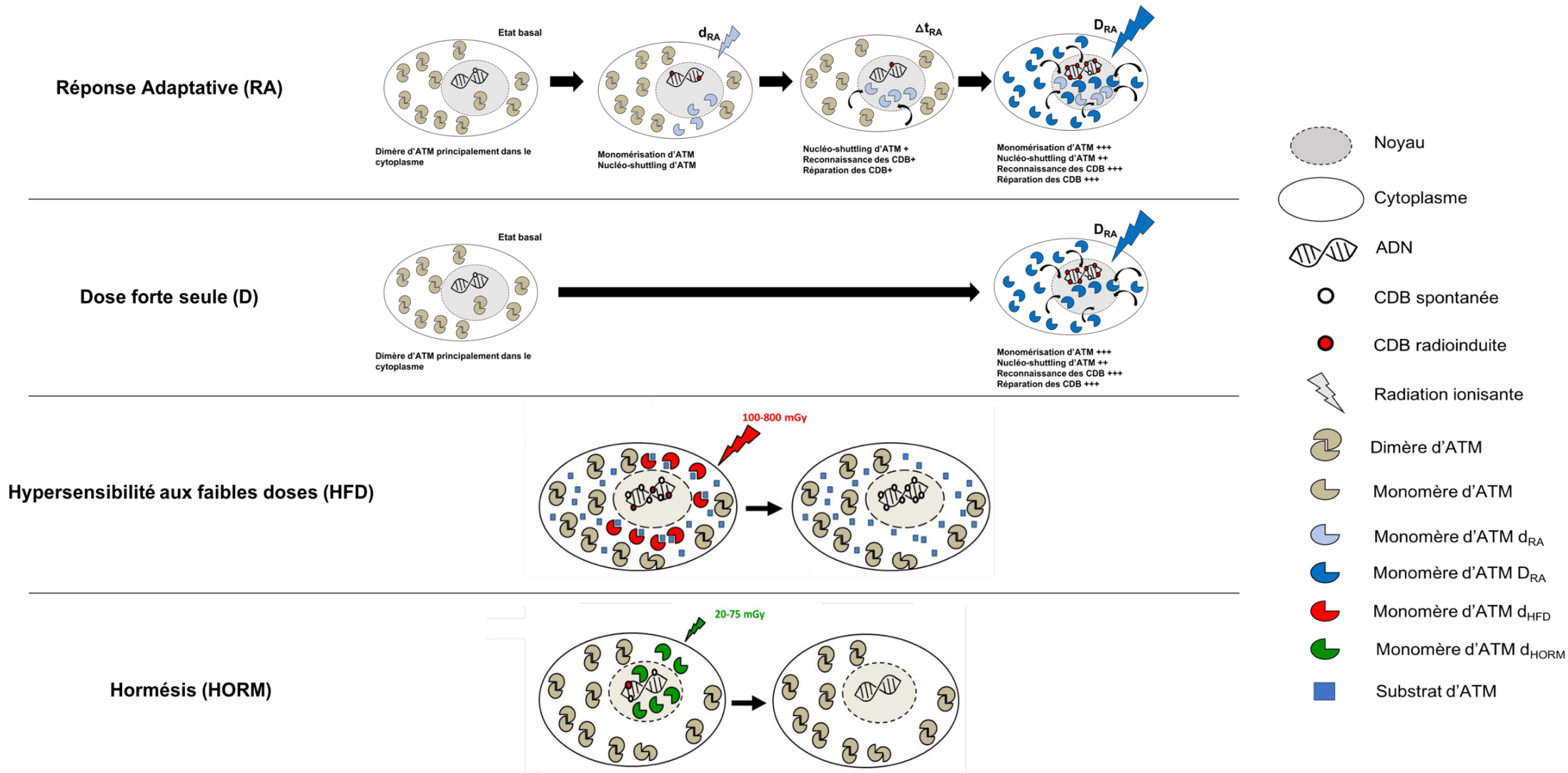


**Figure 41 : Simulation d'un effet biologique de l'irradiation sur une population composée d'individus radiorésistants et radiosensibles.** Nous avons considéré un modèle LNT pour la sous-population radiorésistante (fixé à 80 % de la population totale) et un modèle NLT pour la sous-population radiosensible (fixé à 20 % de la population totale). De plus, nous avons considéré que plus de 20 % des individus radiorésistants présentent une hormèse (**panel A**) et 20 % des individus radiosensibles présentent une HFD (**panel B**). Le panneau **C** montre la somme pondérée des courbes des panneaux **A** et **B**. Le panneau **D** montre l'illustration schématique que la double occurrence de l'hormésis et de la HFD ne peut être correctement ajustée par le LNT.

### **5.1.5 Conclusions**

**L'hormésis, l'HFD et la RA sont des phénomènes radiobiologiques validés expérimentalement avec de nombreux protocoles, observés avec divers modèles cellulaires, paramètres moléculaires, cellulaires et cliniques et qui décrivent des courbes dose-effets différentes. À ce jour, aucune explication mécanistique décrivant ces trois phénomènes spécifiques aux faibles doses n'avait encore été proposé. De plus, pour la première fois à notre connaissance, ils peuvent être considérés ensemble dans un même modèle (figure 42)**





**Figure 42** : Schéma récapitulatif du modèle du transit d'ATM appliqué aux trois phénomènes spécifiques des faibles doses.

## **5.2 Résultats scanographiques expérimentaux**

Les travaux réalisés pendant cette thèse ont permis la soumission de deux articles originaux. L'un sur les expositions cérébrales, l'autre sur les expositions thoraciques. Les parties suivantes résumant les articles présentés en annexe<sup>464,465</sup>.

### **5.2.1 Influence de la radiosensibilité individuelle en radiodiagnostic : Réponse biologique aux expositions scanographiques cérébrales**

#### **5.2.1.1 Doses délivrées en scanographie cérébrale**

Grâce au dispositif IVIsScan présenté dans le paragraphe 2.5 développé par la société Fibermetrix et installé dans trois services de radiologie d'hôpitaux différents en France, nous avons pu recueillir des données cliniques sur les doses délivrées pendant ce type d'examen (tableau 11). Ce tableau regroupe les valeurs dosimétriques données par les scanners pour les trois centres en question, ainsi que les informations correspondantes pour les rapports PRP-HOM-2013-2 et DRPH/SER n°2010-12 réalisés par l'IRSN respectivement sur les années 2012 et 2007. En plus de nous montrer de potentielles évolutions sur les doses délivrées entre 2007 et 2012, le rapport DRPH/SER n°2010-12 nous donne également les doses absorbées calculées pour des examens et des tissus spécifiques. Cela nous permet une comparaison avec les données des protocoles expérimentaux réalisés pendant ce travail de thèse. Les mêmes données sont présentées sur le fantôme anthropomorphique pour les fibroblastes et le fantôme PMMA 16cm de diamètre pour les astrocytes. En clinique, les examens crâniens peuvent être réalisés soit avec une hélice unique, soit avec deux hélices espacées de quelques minutes. En effet, l'injection de produit de contraste (PCI) nécessite parfois l'acquisition d'une autre image sans PCI pour comparaison. Dans certains cas, comme on peut le voir dans le tableau 11, le nombre de répétitions peut atteindre neuf hélices (IRSN PRP-HOM-2013-12). Dans le but d'étudier les phénomènes de répétition de doses qui, on l'a vu auparavant, peuvent dépendre de la radiosensibilité individuelle<sup>422</sup>, deux protocoles expérimentaux ont été réalisés : l'un avec une hélice, l'autre avec deux hélices espacées de cinq minutes. Le temps séparant les deux hélices représente un temps moyen évalué sur vingt examens dans chacun des centres 2 et 3. Les protocoles 1 et 2 hélices ont été réalisés selon les mêmes paramètres. Les valeurs de  $PDL_{tot}$  représentent le Produit Dose Longueur de

la totalité de l'examen. Le  $PDL_{max}$  est le plus haut PDL observé. Le 25<sup>ème</sup> centile de la distribution des PDL est retenu dans certains pays européens dans le cadre de l'optimisation des pratiques radiologiques et recommandé par l'ASN<sup>48</sup>. Le 75<sup>ème</sup> centile de la distribution des PDL est communément utilisé pour l'établissement des niveaux de références diagnostiques (NRD). Le rapport du 75<sup>ème</sup> et du 25<sup>ème</sup> centiles permet d'estimer la dispersion des PDL, en s'affranchissant des éventuelles valeurs aberrantes (basses et hautes)<sup>32</sup>. Les moyennes de  $CTDI_{vol}$  sont les moyennes par hélice. Le  $CTDI_{vol}$  maximum, est le plus haut  $CTDI_{vol}$  observé de l'examen. Les doses absorbées pour le rapport de l'IRSN sont des doses calculées. A noter ici que la dose absorbée « peau » n'est pas renseignée dans ce rapport. La dose au cristallin calculée est renseignée et est celle qui se rapproche le plus de nos conditions expérimentales pour les fibroblastes (proche de la dose « à la surface » du fantôme). Les doses absorbées pour les protocoles expérimentaux représentent les doses mesurées aux cellules grâce à la fibre optique scintillante développée par la société Fibermetrix.

## Scanner crâne

Centre ou protocole expérimental	PDL (mGy.cm)					Moyenne CTDI <sub>vol</sub> Par acquisition (mGy)	Maximum CTDI <sub>vol</sub> Par acquisition (mGy)	Nombre moyen hélices	Nombre max hélices	Dose Absorbée (mGy) (+/- ET)
	Moyenne PDL <sub>tot</sub>	PDL <sub>max</sub>	25 <sup>ème</sup> centile	75 <sup>ème</sup> centile	75 <sup>ème</sup> /25 <sup>ème</sup> centile					
IRSN PRP-HOM-2013-12	870	NR	670	929	1.4	NR	NR	1.2	9	NR
IRSN DRPH/SER n°2010-12	1211	NR	NR	1475	NR	56.5	NR	1.27	NR	Cristallin 72.5* Cerveau 60*
Centre 1	962	1931	659	1294	2	40.3	53.1	1.19	2	NR
Centre 2	990	2669	805	1192	1.5	32.9	60.6	1.85	4	NR
Centre 3	894	3647	756	917	1.1	40.5	57.8	1.29	3	NR
Crâne 1 hélice Fibroblastes	469	510	459	462	1	29.6	32.2	1	1	37.4 (+/-1)**
Crâne 1 hélice Astrocytes	441	482	409	478	1.2	27.3	29.4	1	1	27.2 (+/- 2.5)**
Crâne 2 hélices Fibroblastes	936	1028	917	927	1	29.6	32.8	2	2	75.1 (+/- 2.3)**
Crâne 2 hélices Astrocytes	878	878	885	889	1	27.1	29.1	2	2	55.9 (+/- 5.7)**

SO : sans objet , NR : non renseigné , ET : écart type , \* dose calculée , \*\* dose mesurée

**Tableau 11** : tableau comparatif des différents paramètres dosimétriques (PDL, CTDI<sub>vol</sub>, nombre d'hélices et dose absorbée) entre les rapports IRSN HOM-2013-12 et DRPH/SER n°2010-12, les trois centres où est installé le dispositif IVIscan et les conditions expérimentales pour les scanners du crâne.

## **5.2.1.2 Effets radiobiologiques des expositions scanographiques cérébrales d'une et deux hélices**

### **5.2.1.2.1 Effets radiobiologiques de ces expositions sur les fibroblastes humains**

*Les conditions expérimentales sont détaillées dans la partie matériel et méthode de ce manuscrit.*

Brièvement, des fibroblastes primaires humains de 9 patients montrant différents niveaux de radiosensibilité ont été exposés à un scanner cérébral de 1 (37.5mGy) ou 2 hélices espacées de 5 minutes (37.4 mGy + 5min + 37.4 mGy). Pour chaque condition, le comptage des foci  $\gamma$ H2AX et pATM ont été effectués 10min, 1h, 4h et 24h après irradiation par immunofluorescence.

Concernant les cellules non irradiées (figure 43, temps 0), les fibroblastes radorésistants 100CLB provenant d'un patient en bonne santé montrent un nombre spontané de foci  $\gamma$ H2AX de 0,31 ( $\pm$  0,05) par cellule. Parmi les autres fibroblastes testés, 4 lignées cellulaires (GM03399, 85MA, 01HNG, 13HNG) ont montré un nombre significativement plus élevé de foci  $\gamma$ H2AX spontanés ( $p < 0,001$ ) que les autres lignées testées. Cela suggère une plus grande instabilité génomique de ces cellules, bien que ce nombre n'ait jamais dépassé plus d'un foci par cellule (figure 43A et 43B).

Dix minutes après une exposition une seule hélice (37.4mGy), le nombre moyen de foci  $\gamma$ H2AX était de 1,05 ( $\pm$ 0,15) par cellule dans les témoins radorésistants, ce qui est légèrement inférieur à la valeur attendue si l'on considère un taux d'induction de  $37 \pm 4$  foci  $\gamma$ H2AX par Gy strictement proportionnel à la dose (1,5 foci  $\gamma$ H2AX par cellule était attendu à 37,4 mGy) (figure 43A). Cette différence avec la valeur attendue semblait encore plus faible si l'on supprimait les données spontanées ( $0,75 \pm 0,15$  foci  $\gamma$ H2AX radioinduits) (figure 44A). Cette absence relative de foci  $\gamma$ H2AX radioinduits sera interprétée dans la discussion. Concernant les données brutes des foci  $\gamma$ H2AX 10 minutes après l'irradiation, 5 lignées cellulaires (RACKHAM01, RACKHAM12, 01HNG, 02HNA et 13HNG) ont montré un nombre de foci  $\gamma$ H2AX significativement inférieur à celui des témoins radorésistants ( $p < 0,05$ ) (figure 43A). Lorsque l'on enlève le taux spontané, 7 lignées montrent cette différence (exceptée RACKHAM39), ce qui suggère une reconnaissance plus faible des CDB après irradiation (figure 44A).

Chez les témoins radiorésistants, le nombre de foci  $\gamma$ H2AX a diminué de façon continue avec le temps de réparation entre 10 min et 24 h après l'irradiation pour atteindre un taux de foci  $\gamma$ H2AX qui n'était pas significativement différent du taux spontané. En revanche, toutes les autres lignées cellulaires testées ont obéi à des cinétiques de foci  $\gamma$ H2AX différentes (figures 43A et 44A). Le nombre maximal de foci  $\gamma$ H2AX a été atteint à différents temps de réparation et à différents degrés : dans les lignées cellulaires GM03399, 01HNG et 13HNG, le nombre de foci  $\gamma$ H2AX radioinduit est resté presque constant alors qu'il a atteint sa valeur maximale 1 heure après l'irradiation et a ensuite diminué dans les autres lignées cellulaires. À 24 heures post-irradiation, alors que le nombre de foci  $\gamma$ H2AX restants suggérait une réparation complète des CDB, deux situations majeures ont été rencontrées avec les autres lignées cellulaires :

1) un sous-ensemble de fibroblastes a montré une lente disparition des foci et un nombre de foci  $\gamma$ H2AX restant significativement plus élevé que leur taux spontané non irradié. C'est le cas des lignées cellulaires RACKHAM01, RACKHAM39, GM03399, 85MA, 01HNG et 13HNG.

2) un autre sous-ensemble de fibroblastes a montré une disparition rapide des foci  $\gamma$ H2AX 1h post-irradiation et n'ont pas montré de différence significative 24h après exposition, par rapport à leur taux spontané. C'est le cas de RACKHAM12 et 02HNA. Dans les conditions d'un scanner cérébral avec deux hélices espacées de 5min sur les mêmes fibroblastes, le nombre de foci  $\gamma$ H2AX 10 minutes après l'irradiation a augmenté de manière significative mais pas dans la même mesure selon les lignées cellulaires (figure 43B). Pour les cellules témoins radiorésistantes, le ratio de foci  $\gamma$ H2AX entre les données de l'exposition à double-hélice et l'exposition simple hélice était égal à 2. Ceci est cohérent avec un effet additif de la dose concernant les foci radioinduits.

Ce même ratio était inférieur à 2 pour les lignées cellulaires RACKHAM01, RACKHAM39, 02HNA et GM03399. En revanche, ce ratio était bien plus élevé pour les lignées cellulaires 01HNG, 85MA et RACKHAM12, suggérant que les expositions en double-hélice augmentent la reconnaissance des CDB pour ces lignées.

Étant donné que des effets biologiques significatifs sont observés dans les cellules présentant plus de 2 foci<sup>122</sup>, le pourcentage de cellules présentant plus de 2 foci  $\gamma$ H2AX a été évalué dans toutes les conditions (figures 43C et 43D). En accord avec les données décrites ci-dessus, les lignées cellulaires montrant plus de foci  $\gamma$ H2AX

spontanés sont les mêmes que celles montrant le plus grand nombre de cellules avec plus de 2 foci  $\gamma$ H2AX. Après une exposition scanographique, qu'il s'agisse d'un scanner à 1 ou 2 hélices, après un temps post-irradiation supérieur à 10 minutes, les cellules des patients radiosensibles et/ou radiosusceptibles ont montré un pourcentage plus élevé de cellules présentant plus de 2 foci  $\gamma$ H2AX.

Comme l'activité ATM est nécessaire pour la formation des foci  $\gamma$ H2AX, nous avons également étudié le nombre de foci nucléaires pATM comptés dans les mêmes conditions expérimentales que celles décrites ci-dessus. Les données pATM ont permis de consolider nos conclusions en ce qui concerne les conditions d'exposition à 1 ou 2 hélices (figure 45 et 46).

#### **5.2.1.2.2 Effets radiobiologiques de ces expositions sur les astrocytes humains**

Les cellules du cerveau, et notamment les astrocytes, sont les modèles cellulaires les plus appropriés pour étudier les risques liés à l'exposition scanographique cérébrale. Cependant, pour des raisons éthiques et pratiques, les astrocytes humains ont été très rarement utilisés dans les études radiobiologiques, et plus particulièrement dans le contexte du radiodiagnostic. Ici, les mêmes conditions d'exposition au scanner crânien que celles décrites ci-dessus pour les fibroblastes ont été appliquées aux astrocytes provenant du même donneur. Dans un premier temps, nous nous sommes concentrés sur les astrocytes du cortex, de l'hippocampe, de la moelle épinière et du tronc cérébral. En ce qui concerne les foci  $\gamma$ H2AX spontanés, aucune différence entre les lignées cellulaires d'astrocytes n'a été observée : moins de 0,5 foci  $\gamma$ H2AX spontané par cellule a été compté, de manière similaire aux fibroblastes 100CLB radiorésistants (figure 47A et 47B). Dix minutes après exposition à une seule hélice, les astrocytes de l'hippocampe (HA-h) ont montré un taux de foci  $\gamma$ H2AX par cellule de 1,33 (+/-0.13), ce qui est légèrement supérieur à la valeur attendue si l'on considère un taux d'induction de  $37 \pm 4$  foci  $\gamma$ H2AX par Gy strictement proportionnel à la dose (1,08 foci  $\gamma$ H2AX par cellule était attendu à 27,2 mGy) (figure 47A). Cette différence avec la valeur attendue s'annule si l'on supprimait les données spontanées ( $1.03 \pm 0,19$  foci  $\gamma$ H2AX radioinduits) (figure 48A). Concernant les astrocytes du cortex (HA), de la moelle épinière (HA-sp) et du tronc cérébral (HA-bs), ils présentaient des données

similaires entre eux avec moins de 1 foci  $\gamma$ H2AX par cellule et étaient statistiquement différent des données HA-h ( $p < 0,001$ ) (figure 47A).

Il est intéressant de noter que si les astrocytes de l'hippocampe (HA-h) ont montré un taux maximum plus élevé de CDB radioinduites 10 minutes après l'irradiation, le nombre de foci  $\gamma$ H2AX a continuellement diminué avec le temps de réparation pour atteindre le plus petit taux de foci  $\gamma$ H2AX restants 24 heures après l'irradiation, équivalent au taux spontané. Cela suggère donc une réparation des CDB complète. En revanche, tous les autres astrocytes ont montré un nombre maximum de foci  $\gamma$ H2AX à 1 heure post-irradiation. Les astrocytes du cortex (HA) et du tronc cérébral (HA-bs) ont montré un nombre significativement plus élevé ( $p < 0.05$ ) de foci restants 24h après irradiation comparé au nombre spontané. Ceci suggère à la fois une reconnaissance et une réparation incomplète des CDB dans ces lignées. Les astrocytes de la moelle épinière (HA-sp) ont montré une reconnaissance incomplète des CDB mais un taux de réparation normal. Après une exposition à 2 hélices, le nombre de foci  $\gamma$ H2AX à 10 min après l'irradiation a augmenté de manière significative et similaire dans tous les astrocytes mais, comme pour les fibroblastes, ne correspondait pas au double du nombre de foci  $\gamma$ H2AX obtenu après 1 seule hélice (figure 47B). En d'autres termes, le rapport des foci  $\gamma$ H2AX entre les données du CT scan à double hélice et celles du CT scan à une hélice s'est avéré inférieur à 2, ce qui suggère un effet infra-additif pour tous les astrocytes testés. Il est intéressant de noter que, lors de l'exposition au scanner à double hélice, tous les astrocytes ont montré un nombre maximal de foci  $\gamma$ H2AX atteint à 1 heure au lieu de 10 minutes après l'irradiation, ce qui suggère que la reconnaissance des CDB n'est pas complète au début de l'irradiation.

Comme pour les fibroblastes, nous avons évalué les pourcentages de cellules ayant plus de 2 foci  $\gamma$ H2AX (figures 47C et 47D), et le nombre de foci pATM dans les mêmes conditions expérimentales (figures 5A et 5B) : les conclusions tirées de ces deux paramètres étaient similaires à celles suggérées par les données décrites ci-dessus.



### **5.2.1.3 Discussion**

#### **5.2.1.3.1 Discussion doses délivrées en scanographie cérébrale**

##### **5.2.1.3.1.1 Recueil des données**

Le recueil de données réalisé dans le tableau 11 grâce au dispositif IVIsScan de la société Fibermetrix ne se veut pas exhaustif. Il a surtout pour but de fournir des informations pertinentes afin de vérifier que les protocoles expérimentaux reflètent des situations cliniques. En effet, plusieurs difficultés ont été rencontrées lors de ce recueil de données. Le nom des protocoles affiché par les scanners peut varier énormément pour le même type d'examen en fonction, par exemple, du radiologue qui réalise l'examen ou de l'indication. De plus, l'injection ou non de produit de contraste n'est pas forcément renseignée et il est donc difficile de différencier un protocole crâne avec injection, d'un protocole crâne sans injection. C'est pourquoi, afin de mieux refléter les données recueillies dans les trois centres, les valeurs concernant les deux rapports IRSN sont moyennées entre ces deux types de protocoles. D'autre part, une grande partie des examens récoltés n'a pas pu être inclus dans ce tableau étant donné que des hélices TAP sont parfois réalisées lors, et donc sous le nom, d'un protocole crâne. Il en résulte des valeurs de PDL aberrantes et inexactes pour des protocoles crâne. Ceci est d'autant plus vrai pour les centres 1 et 2 qui sont des centres anti-cancer contrairement au centre 3 qui est un CHU. En effet, dans les centres anti-cancer, il est plus probable, par exemple, d'avoir un scanner TAP en même temps qu'un scanner crâne lorsque l'on recherche des métastases. On peut également imaginer que dans un CHU les scanners sont plus localisés et spécifiques d'une pathologie ou d'un traumatisme précis. Ainsi, le nombre d'examens recueilli peut varier de  $n=1562$  pour le centre 3 à  $n=30$  pour le centre 1. Ceci explique notamment la valeur haute du rapport 25<sup>ème</sup>/75<sup>ème</sup> centile pour ce centre. Ces difficultés ont également été rencontrées par l'IRSN dans son recueil de données pour le rapport PRP-HOM n°2013-12<sup>32</sup>.

##### **5.2.1.3.1.2 Discussion sur les PDL**

Concernant les PDL, on observe une baisse des valeurs moyennes entre les rapports de l'IRSN de 2007 et de 2012. Ceci peut être dû aux évolutions technologiques des machines au niveau de la réduction de dose et à une amélioration de l'optimisation des protocoles. Il est cependant important de noter que ces données ont été recueillies

auprès de services volontaires et équipés d'un système informatique de recueil des doses-patient. Ces services semblent donc avoir d'ores et déjà intégré la radioprotection des patients dans leurs pratiques. Cela peut donc constituer un biais de sélection si l'on souhaite étendre ces résultats à l'échelle nationale car il est possible que cela ne soit pas représentatif de certains services moins sensibilisés à ces sujets. Les chiffres des trois centres semblent plus se rapprocher des données de 2012. Concernant les valeurs de PDL expérimentales, elles sont plus basses que les valeurs cliniques notamment pour les protocoles « une hélice ». Les expériences radiobiologiques ont été réalisées dans le centre 2. On peut donc constater au vu des valeurs dans ce dernier, que la large majorité des examens cérébraux sont réalisés avec deux hélices et injection de produit de contraste. A noter que les valeurs du centre 3 sont la plupart du temps atteintes en une hélice (moyenne de PDL/hélice = 807 pour centre 3, moyenne de PDL/hélice = 544 pour centre 2, données non montrées). Ces valeurs peuvent varier selon le type de scanner utilisé et le constructeur de ce dernier, ainsi que les pratiques des différents services. On remarque d'ailleurs que pour le même centre, les valeurs de PDL peuvent significativement varier (voir  $DLP_{max}$ ) et être trois fois supérieures au PDL moyen (centre 3). Cependant, ces valeurs ne dépassent pas forcément les NRD étant donné qu'ils sont déterminés par acquisition et non sur la totalité des examens. D'ailleurs, comme on l'a vu en introduction, L'ASN recommande une modification des niveaux de référence diagnostiques (NRD) concernant ce point<sup>48</sup>. Ces valeurs maximales sont surtout atteintes à cause d'hélices répétées qui peuvent atteindre 9 (rapport IRSN PRP-HOM-2013-12). Si on compare maintenant les données expérimentales entre le fantôme fibroblastes et le fantôme astrocytes, on remarque que celles du fantôme astrocytes sont plus basses. Ceci est probablement dû à la différence de composition et de géométrie entre les deux fantômes, étant donné que le scanner module les doses délivrées en fonction du « patient ». Pour les mêmes raisons, le rapport 25<sup>ème</sup>/75<sup>ème</sup> centile des protocoles expérimentaux est systématiquement inférieur à celui des protocoles cliniques, étant donné que nous irradiions toujours le même fantôme alors que les scanners vont moduler la dose en fonction de la morphologie du patient.

#### **5.2.1.3.1.3 Discussion sur les CTDI<sub>vol</sub> et la dose absorbée**

Concernant les CTDI<sub>vol</sub> moyens, qui sont donnés par acquisition, une baisse est observée entre le rapport de l'IRSN de 2007 et les données des centres 1, 2 et 3. Ceci s'explique également par les évolutions technologiques des machines évoqué pour les PDL. Malgré ces évolutions, le CTDI<sub>vol</sub>, peut encore atteindre dans certains cas 60 mGy (CTDI<sub>max</sub> centre 2). Le CTDI<sub>vol</sub> expérimental est plus bas que les CTDI<sub>vol</sub> cliniques. Ceci peut être dû à une moindre complexité et l'absence d'os dans la composition des fantômes et donc une difficulté moindre des rayons X pour traverser la matière. Concernant la dose absorbée, les doses aux fibroblastes et aux astrocytes sont proches des doses calculées dans le rapport de l'IRSN pour respectivement le cristallin et le cerveau, ce qui valide nos modèles expérimentaux.

**Il est important de noter, d'après cette analyse non exhaustive des doses délivrées en scanographie cérébrale, que nos conditions expérimentales se situent, au niveau dosimétrique, dans la partie basse des valeurs observées dans ce type d'examen.**

#### **5.2.1.3.2 Discussion sur les effets radiobiologiques des expositions scanographiques cérébrales**

Il existe un certain nombre d'études radiobiologiques visant à évaluer les risques radioinduits liés à l'exposition aux scanners. La grande majorité d'entre elles ont porté sur des lymphocytes<sup>413</sup>. Ici, pour la première fois à notre connaissance, des fibroblastes primaires de patients présentant une radiosensibilité/radiosusceptibilités différente et des astrocytes primaires du même donneur mais provenant de différentes localisations cérébrales ont été exposés à un examen crâne de 1 et 2 hélices. Nos résultats suggèrent que le facteur individuel dans les fibroblastes et l'origine de la localisation cérébrale des astrocytes peuvent présenter des réponses biologiques différentes pour les biomarqueurs  $\gamma$ H2AX et pATM. Comme ces deux biomarqueurs reflètent la fonctionnalité de la reconnaissance et de la réparation des CDB, nos données fournissent des indices selon lesquels, même pour des expositions au scanner à une seule hélice (correspondant ici à 37,4 mGy), la dose biologique peut être différente de la dose physique. L'un des exemples les plus représentatifs de cette différence est le nombre de foci  $\gamma$ H2AX résiduels 24 heures après l'irradiation qui peut

être 2 à 3 fois plus élevé dans les cellules de certains patients souffrant de syndromes associés à la radiosensibilité et/ou à la radiosusceptibilité comparé au témoin. Ces résultats suggèrent fortement que la dose physique n'est pas suffisante à elle seule pour refléter les risques liés à l'exposition scanographique.

Dans le cadre du modèle du transit d'ATM, ces résultats sont en accord avec les études précédentes : l'exposition aux rayonnements à faible dose induit un faible nombre de CDB dans le noyau. Par conséquent, particulièrement pour les cellules radiosensible et/ou radiosusceptible du groupe II, peu de monomères ATM diffusent dans le noyau et certaines CDB ne peuvent ne pas être reconnus. Dans cette étude, les lignées cellulaires de fibroblastes présentaient des mutations p53+/- (lignée cellulaire 85MA ; syndrome de Li-Fraumeni, absence de radiosensibilité significative mais radiosensibilité élevée), des mutations ATM+/- (lignée cellulaire GM03399 ; parents de patients atteints d'ataxie télangiectasie ; absence de radiosensibilité significative mais radiosensibilité élevée) et des mutations NF1+/- (lignées cellulaires RACKHAM ; neurofibromatose de type 1 ; radiosensibilité nulle ou modérée et radiosensibilité élevée). De plus, 3 lignées de fibroblastes provenant de patients ayant montré une radiosensibilité de grade 1-4 pendant ou après leur radiothérapie anticancéreuse (01HNG, 02HNA, 13HNG) ont également été utilisées dans cette étude. Toutes ces lignées cellulaires ont systématiquement montré un retard de transit d'ATM après 2 Gy de rayons X : elles appartiennent au groupe II de radiosensibilité défini par ailleurs<sup>122</sup>. Nous avons déjà évoqué le fait que les cellules du groupe II peuvent montrer un phénomène d'hypersensibilité aux faibles doses (HFD) qui est dû au manque de reconnaissance des CDB<sup>466,474</sup>. Il est intéressant de noter que la gamme de doses optimale pour observer un phénomène d'HFD avec le débit de dose appliqué dans ce type d'examen scanographique (100 mGy/min) a été déterminée comme étant [10-50 mGy]<sup>390</sup>, ce qui est en accord avec les données actuelles. Ainsi, les faibles valeurs de foci  $\gamma$ H2AX à 10 minutes après irradiation dans les fibroblastes du groupe II sont très cohérentes avec le modèle de transit d'ATM. En effet, ces données s'expliquent par un manque de monomères ATM dans le noyau pour phosphoryler  $\gamma$ H2AX et reconnaître les CDB. Cette hypothèse est consolidée par le fait que le nombre maximal de foci  $\gamma$ H2AX a été observé à 1h plutôt qu'à 10 min post-irradiation. Il est intéressant de noter que la dose de 37,4 mGy pour un scanner cérébral à une seule hélice peut également être faible pour les cellules radiorésistantes

et expliquer pourquoi le nombre de foci  $\gamma$ H2AX a été trouvé plus faible que prévu chez les témoins, également. Il est à noter que ces valeurs théoriques sont extrapolées à partir des données à forte dose. Ce ratio pourrait ne pas être le même dans la gamme des faibles doses. Alors que les cellules du groupe II sont toutes caractérisées par un manque plus important de reconnaissance des CDB, nous avons observé un nombre plus élevé de foci  $\gamma$ H2AX 24 heures après l'irradiation, ce qui suggère une réparation incomplète des CDB dans certaines lignées seulement. Dans ce cadre, l'évaluation du nombre de foci  $\gamma$ H2AX à 10 min et 24h après l'irradiation peuvent donc servir d'indicateurs de radiosensibilité et/ou de radiosusceptibilité, comme cela a déjà été suggéré<sup>122</sup>. Cependant, il faut souligner ici que les doses appliquées lors d'exams scanographiques ne sont pas suffisamment élevées pour déclencher une réaction tissulaire significative (radiosensibilité).

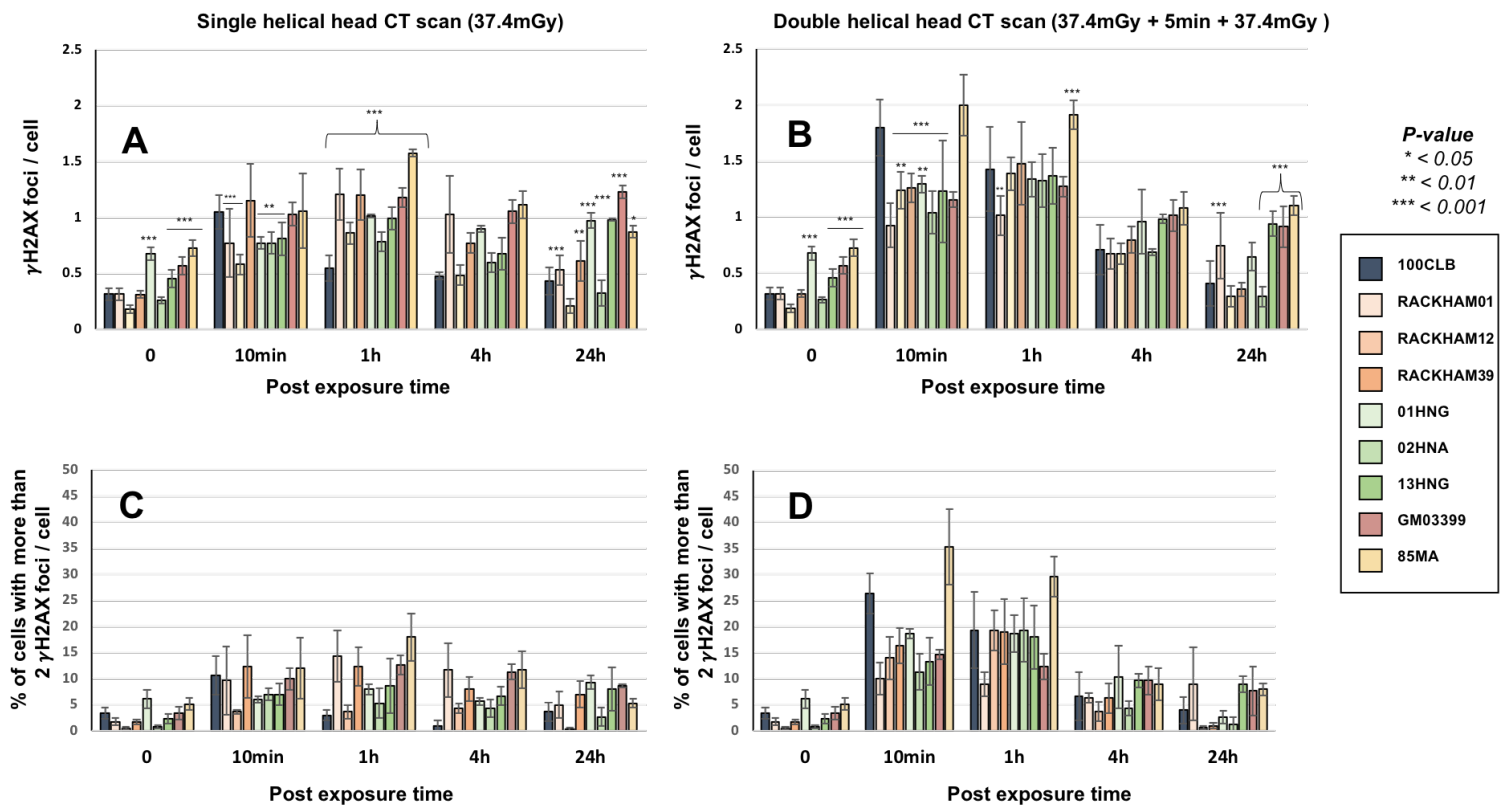
Ce dernier point soulève deux questions : que deviennent les cellules présentant des CDB non réparées après une exposition au scanner ? Comment quantifier le risque de cancers potentiels induits par une exposition au scanner ?

Si l'on considère les données des foci  $\gamma$ H2AX 24 heures après l'irradiation, il est intéressant de noter que, même après des expositions scanographiques avec deux hélices, le nombre de foci  $\gamma$ H2AX radioinduits ne dépasse pas 1 et représente donc un niveau sub-létal plutôt que létal de CDB restantes. Par conséquent, la concurrence entre une mauvaise réparation et une réparation incomplète des CDB peut dépendre fortement du niveau de radiosensibilité et/ou du niveau de radiosusceptibilité de chaque lignée cellulaire. De plus, si des CDB mal réparées et des CDB non réparées sont accumulées et donc tolérées par des séances répétées de scanographie, il faut également tenir compte de l'effet du vieillissement qui peut produire plusieurs cassures d'ADN dans le noyau. Des recherches plus approfondies sont donc nécessaires pour mieux quantifier le risque de chacune des conséquences cliniques d'une exposition aux rayonnements ionisants, à savoir la radiosensibilité, la radiosusceptibilité et le vieillissement accéléré (radiodégénération) et à quels seuils elles peuvent devenir significatives.

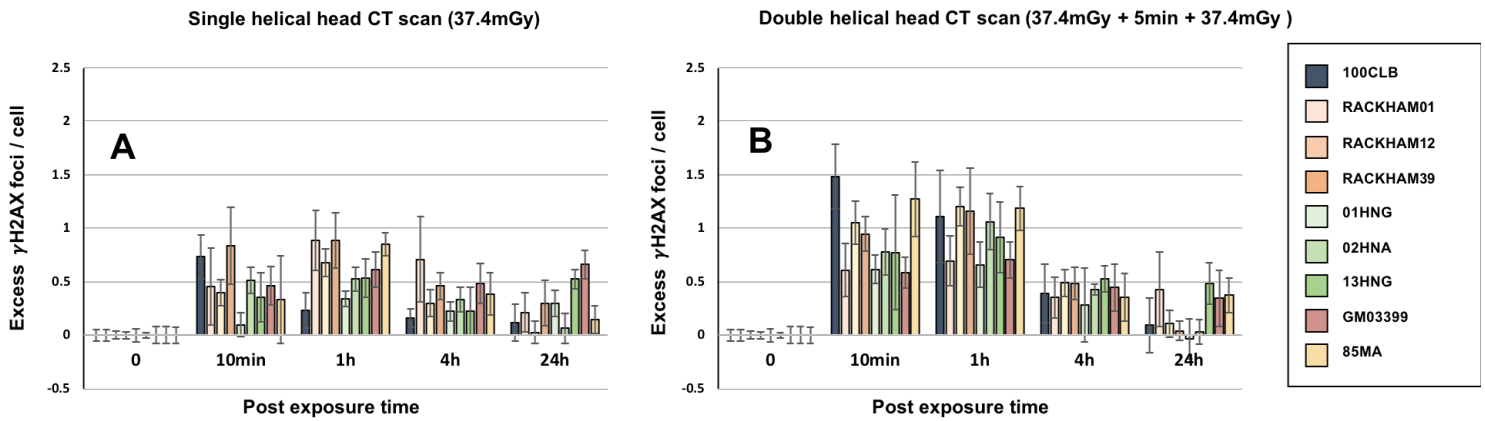
Enfin, il faut souligner ici que l'absence de biomarqueur spécifique à la radiosusceptibilité est l'une des limites majeures des études visant à évaluer le risque potentiel d'exposition au scanner. Même si la mauvaise réparation des CDB, l'hyperrecombinaison et l'instabilité génomique sont systématiquement associées à la prédisposition au cancer, un biomarqueur fiable qui serait applicable dans les

conditions des examens scanographiques est nécessaire. Néanmoins, il convient de noter que si, pour une dose physique donnée, le nombre de CDB reconnues et/ou résiduels diffère sensiblement selon les patients, cela devrait être suffisant pour intégrer ces résultats dans la discussion concernant la justification des examens. Il est évident, là encore, qu'un certain nombre d'études et de données supplémentaires sont nécessaires pour quantifier le risque pour un statut génétique donné. Toutefois, les données présentées ici fournissent de nouveaux indices selon lesquels, même pour une exposition à faible dose appliquée dans le cadre d'examens scanographiques, les cellules de certains patients peuvent présenter une réponse biologique très différente à cette exposition.

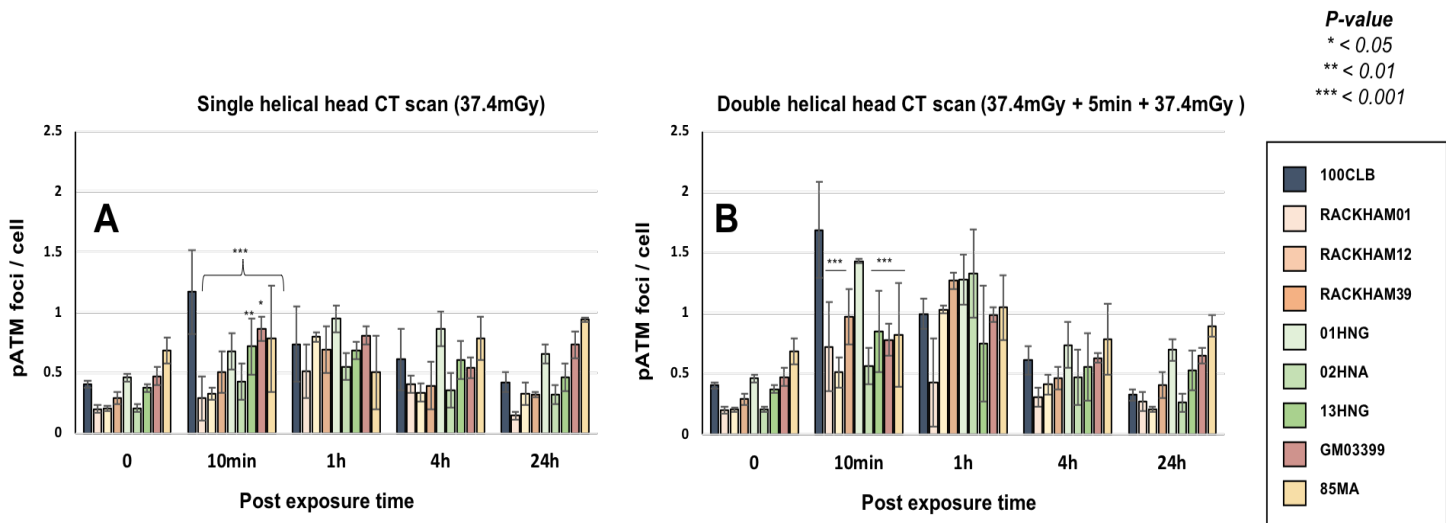
### 5.2.1.3.3 Figures expositions scanographiques cérébrales<sup>464</sup>



**Figure 43 :** Cinétique des foci  $\gamma$ H2AX dans les fibroblastes après un scanner cérébral 1 hélice (A), ou un scanner 2 hélices espacées de 5min (B) aux temps indiqués après exposition ( $t_0$  = non irradié). Les données (en bas) indiquent le pourcentage de cellules ayant plus de deux foci après un scanner 1 hélice (C) ou un scanner avec 2 hélices (D) aux temps indiqués après exposition ( $t_0$  = non irradié). Les barres d'erreur indiquent l'écart type des moyennes des 3 expériences indépendantes. \* Les étoiles dans les conditions non irradiées et aux temps 10min et 1h après l'irradiation correspondent à une différence statistiquement significative par rapport au témoin radorésistant. Les étoiles à 24 heures après l'irradiation correspondent à une différence statistiquement significative par rapport aux conditions non irradiées des mêmes lignées.

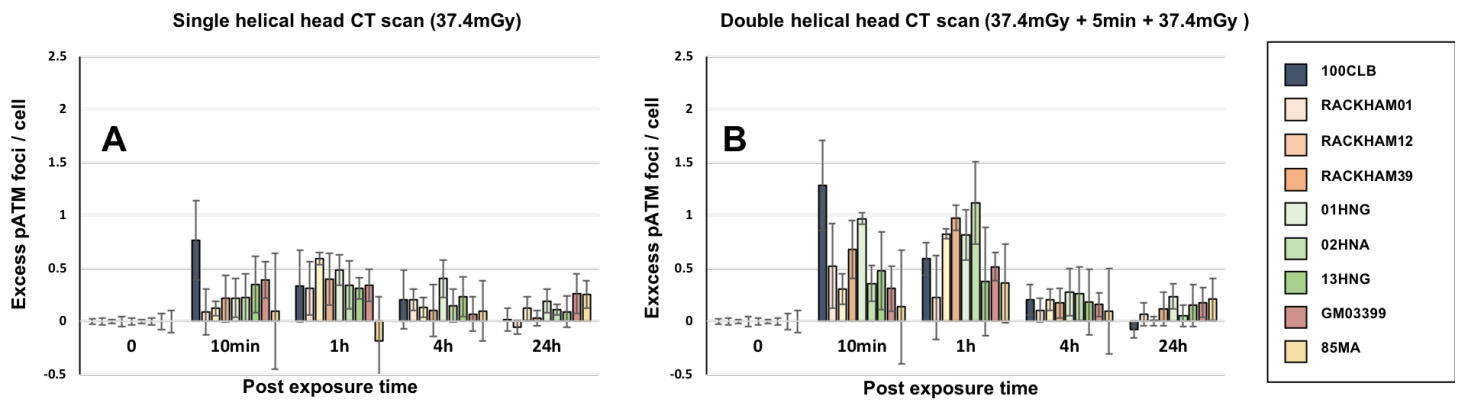


**Figure 44 :** Cinétique de l'excès de foci  $\gamma$ H2AX dans les fibroblastes après un scanner cérébral 1 hélice (A), ou un scanner cérébral 2 hélices (B) aux temps indiqués après exposition ( $t_0$  = non irradié). Les données ont été obtenues par soustraction des données spontanées pour chaque lignée. Les barres d'erreur indiquent l'écart type des moyennes des 3 expériences indépendantes.

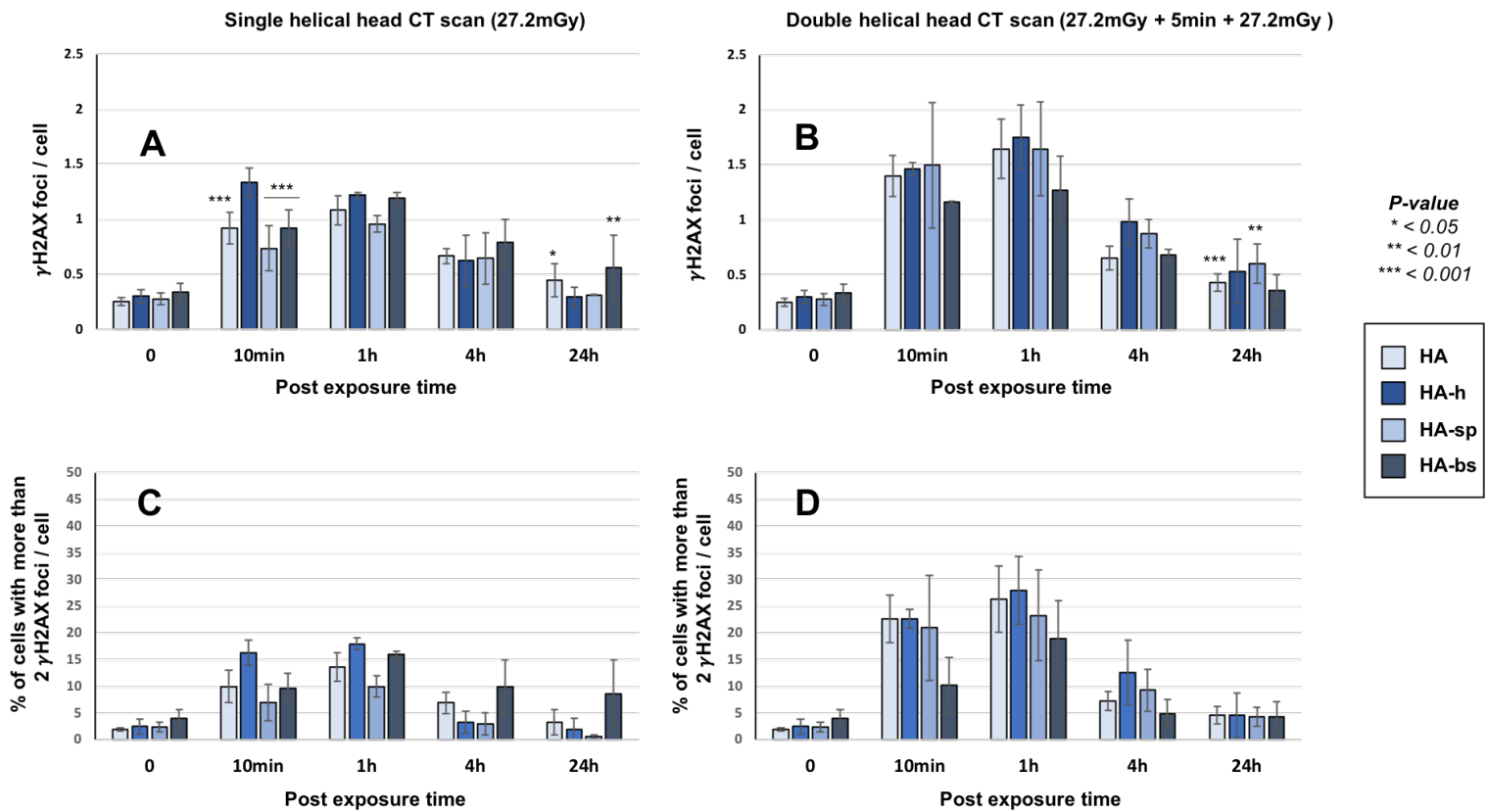


**Figure 45 :** Cinétique des foci pATM dans les fibroblastes après un scanner cérébral 1 hélice (A), ou un scanner cérébral 2 hélices (B) aux temps indiqués après exposition ( $t_0$  = non irradié). Les barres d'erreur indiquent l'écart type des moyennes des 3 expériences indépendantes. \*Les étoiles à 10 minutes après l'irradiation correspondent à une différence statistiquement significative par rapport au témoin radiorésistant.

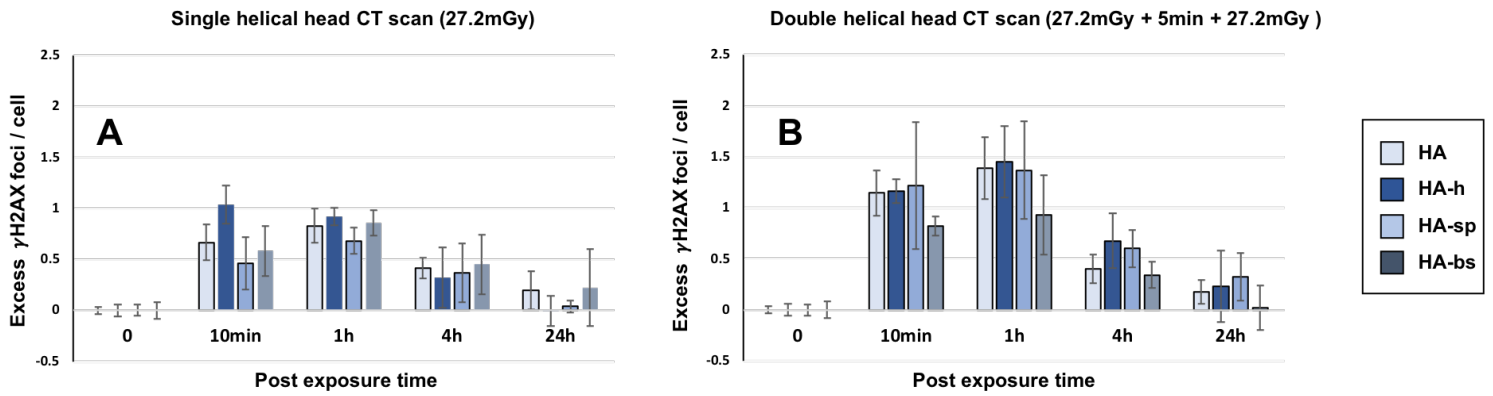




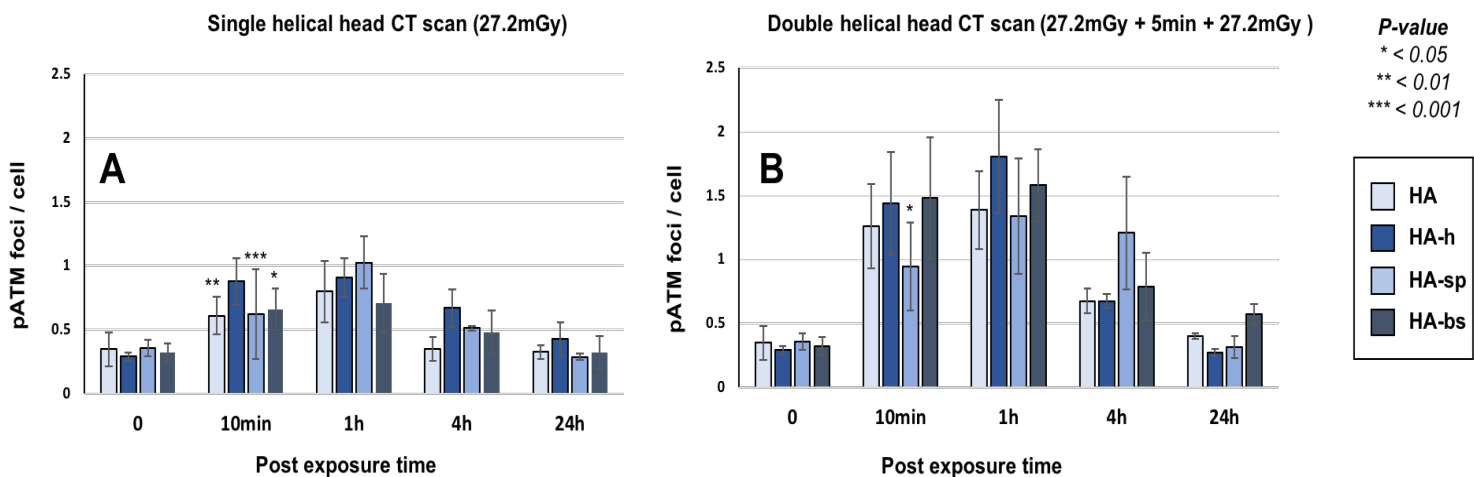
**Figure 46** : Cinétique de l'excès de foci pATM dans les fibroblastes après un scanner cérébral 1 hélice (A), ou un scanner cérébral 2 hélices (B) aux temps indiqués après exposition ( $t_0$  = non irradié). Les données ont été obtenues par soustraction des données spontanées pour chaque lignée. Les barres d'erreur indiquent l'écart type des moyennes des 3 expériences indépendantes.



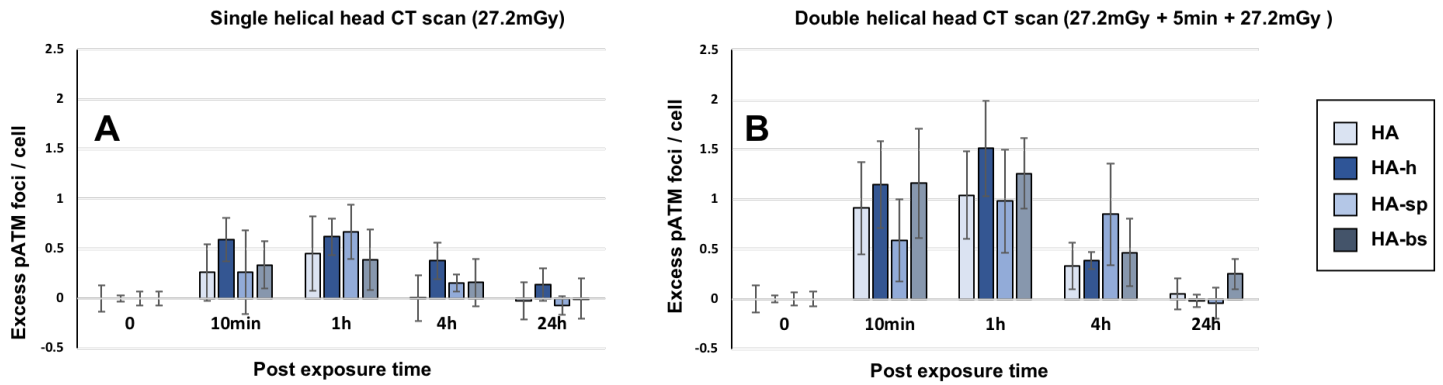
**Figure 47 :** Cinétique des foci  $\gamma$ H2AX dans les astrocytes après un scanner cérébral 1 hélice (A), ou un scanner cérébral 2 hélices (B) aux temps indiqués après exposition ( $t_0$  = non irradié). Les données (en bas) indiquent le pourcentage moyen de cellules ayant deux foci ou plus après un scanner cérébral 1 hélice (C), ou un scanner cérébral 2 hélice (D) aux temps indiqués après exposition ( $t_0$  = non irradié). Les barres d'erreur indiquent l'écart type des moyennes des 3 expériences indépendantes. \*Les étoiles dans les conditions non irradiées et aux temps 10min et 1h après exposition correspondent à une différence statistiquement significative par rapport au témoin radorésistant. Les étoiles à 24 heures après exposition correspondent à une différence statistiquement significative par rapport aux conditions non irradiées.



**Figure 48** : Cinétique de l'excès de foci  $\gamma$ H2AX dans les astrocytes après un scanner cérébral 1 hélice (A), ou un scanner cérébral 2 hélices (B) aux temps indiqués après exposition ( $t_0$  = non irradié). Les données ont été obtenues par soustraction des données spontanées pour chaque individu. Les barres d'erreur indiquent l'écart type des moyennes des 3 expériences indépendantes.



**Figure 49** : Cinétique des foci pATM dans les astrocytes après un scanner cérébral 1 hélice (A), ou un scanner cérébral 2 hélices (B) aux temps indiqués après exposition ( $t_0$  = non irradié). Les barres d'erreur indiquent l'écart type des moyennes des 3 expériences. \*Les étoiles aux temps 10min après exposition correspondent à une différence statistiquement significative entre les lignées cellulaires astrocytes entre elles.



**Figure 50 :** Cinétique de l'excès de foci pATM dans les astrocytes après un scanner cérébral 1 hélice (A), ou un scanner cérébral 2 hélices (B) aux temps indiqués après exposition ( $t_0$  = non irradié). Les données ont été obtenues par soustraction des données spontanées pour chaque lignée. Les barres d'erreur indiquent l'écart type des moyennes des 3 expériences indépendantes.

## **5.2.2 Influence de la radiosensibilité individuelle en radiodiagnostic : Réponse biologique aux expositions scanographiques thoraciques**

### **5.2.2.1 Doses délivrées en scanographie thoracique**

Grâce à ce même dispositif IVIscan, nous avons également pu recueillir des données cliniques sur les doses délivrées pendant des examens du thorax (tableau 12). Ce tableau regroupe les valeurs dosimétriques données par les scanners pour les trois centres en question ainsi que les informations correspondantes pour les rapports PRP-HOM-2013-2 et DRPH/SER n°2010-12 réalisés par l'IRSN respectivement sur les années 2012 et 2007. Les mêmes données sont présentées sur le fantôme PMMA de 32cm de diamètre utilisé pour les fibroblastes et les cellules épithéliales mammaires. En clinique, les examens thoraciques sont généralement délivrés en une seule hélice (moyenne 1.02 et 1.03 pour les centres 1 et 2). Cependant, dans certains cas, comme on peut le voir dans le tableau 12, le nombre de répétitions peut atteindre 8 hélices (IRSN PRP-HOM-2013-12). En revanche, nous avons ici voulu tester l'effet du topogramme. Le topogramme ou « scout view » est une hélice de très faible dose (PDL moyen de 7 mGy.cm en condition expérimentale) qui sert pour le repérage de la zone à explorer et également à la modulation de la dose par le scanner. Dans le but d'étudier les phénomènes de répétition de doses qui, on l'a vu auparavant, peuvent dépendre de la radiosensibilité individuelle<sup>422</sup>, deux protocoles expérimentaux ont été réalisés : l'un avec une hélice et l'autre avec un topogramme une minute avant une hélice. Le temps séparant le topogramme de l'hélice représente un temps moyen évalué sur vingt examens dans chacun des centres 2 et 3. L'hélice des deux protocoles a été réalisée selon les mêmes paramètres. Les valeurs de  $PDL_{tot}$  représentent le Produit Dose Longueur de la totalité de l'examen. Le  $PDL_{max}$  est le plus haut PDL observé. Le 25<sup>ème</sup> centile de la distribution des PDL est retenu dans certains pays européens dans le cadre de l'optimisation des pratiques radiologiques et recommandé par l'ASN<sup>48</sup>. Le 75<sup>ème</sup> centile de la distribution des PDL est communément utilisé pour l'établissement des niveaux de références diagnostiques (NRD). Le rapport du 75<sup>ème</sup> et du 25<sup>ème</sup> centile permet d'estimer la dispersion des PDL, en s'affranchissant des éventuelles valeurs aberrantes (basses et hautes)<sup>32</sup>. Les moyennes de  $CTDI_{vol}$  sont les moyennes par hélice. Le  $CTDI_{vol}$  maximum est le plus haut  $CTDI_{vol}$  observé pour l'examen. Les doses absorbées pour le rapport de l'IRSN sont des doses calculées. A noter ici que

la dose absorbée « peau » n'était pas renseignée dans ce rapport, seule la dose « sein », qui se rapproche le plus de nos conditions expérimentales, est renseignée. Les doses absorbées pour les protocoles expérimentaux représentent les doses mesurées aux cellules grâce à la fibre optique scintillante développée par la société Fibermetrix.

## Scanner thorax

Centre ou protocole expérimental	PDL (mGy.cm)					Moyenne CTDI <sub>vol</sub> Par acquisition (mGy)	Maximum CTDI <sub>vol</sub> Par acquisition (mGy)	Nombre moyen d'hélices	Nombre max hélices	Dose Absorbé (mGy) (+/- ET)
	Moyenne PDL <sub>tot</sub>	PDL <sub>max</sub>	25 <sup>ème</sup> centile	75 <sup>ème</sup> centile	75 <sup>ème</sup> /25 <sup>ème</sup> centile					
IRSN PRP-HOM-2013-12	461	NR	249	539	2.2	NR	NR	1.2	8	NR
IRSN DRPH/SER n°2010-12	445	NR	NR	535.5	NR	11.9	NR	1.05	NR	Seins 20*
Centre 1	286	1026	159	381	2.4	7.3	25.2	1.02	3	NR
Centre 2	347	1783	264	417	1.6	7.2	16.1	1.03	4	NR
Centre 3	264	2797	125	279	2.2	5.3	21.3	1.28	5	NR
Thorax Fibroblastes et cellules épithéliales mammaires	136	190	131	134	1	8.1	10.5	1	1	14.4 (+/- 1.9)**
Topogramme	7	SO	SO	SO	SO	0.13	SO	1	1	1.1 (+/- 0.1)**

SO : sans objet , NR : non renseigné , ET : écart type , \* dose calculée , \*\* dose mesurée

**Tableau 12** : tableau comparatif des différents paramètres dosimétriques (PDL, CTDI<sub>vol</sub>, nombre d'hélices et dose absorbée) entre les rapports IRSN HOM-2013-12 et DRPH/SER n°2010-12, les trois centres où est installé le dispositif IVIsScan et les conditions expérimentales pour les scanners du thorax.

## 5.2.2.2. Résultats radiobiologiques

### 5.2.2.2.1 Effets radiobiologiques d'un scanner thoracique sur les fibroblastes humains primaires

*Les conditions expérimentales sont détaillées dans la partie matériel et méthode de ce manuscrit.*

Brièvement, des fibroblastes humains primaires provenant de 12 patients présentant diverses radiosensibilités et/ou radiosusceptibilités individuelles ont été soumis à une seule hélice de scanner thoracique (14,4 mGy). Pour chaque condition, les foci  $\gamma$ H2AX et pATM ont été mesurés 10 min, 1h, 4h et 24 h après l'irradiation par immunofluorescence.

En ce qui concerne les cellules non irradiées (figure 51A), alors que les fibroblastes témoins radiorésistants 100CLB ont montré un nombre de foci  $\gamma$ H2AX de 0,31 ( $\pm$  0,05) par cellule, 7 lignées cellulaires (GM03399, 85MA, 01HNG, 13HNG, 101CLB, 103CLB) ont montré un nombre significativement plus élevé de foci  $\gamma$ H2AX spontanés ( $p < 0,001$ ) que les autres lignées cellulaires testées. Ceci suggère une plus grande instabilité génomique (figure 51A). Dix minutes après exposition à une seule hélice de scanner thoracique, le nombre moyen de foci  $\gamma$ H2AX s'est avéré être de  $0,93 \pm 0,04$  foci  $\gamma$ H2AX par cellule dans les témoins radiorésistants (100CLB). Cela est légèrement supérieur à la valeur attendue si l'on considère un taux d'induction de  $37 (\pm 4)$  foci  $\gamma$ H2AX par Gy strictement proportionnel à la dose (0,57 foci  $\gamma$ H2AX par cellule était attendu à 14,4 mGy) (figure 51A). Cette différence semblait cependant cohérente si l'on supprimait les données spontanées ( $0,62 \pm 0,09$  foci  $\gamma$ H2AX dus au rayonnement uniquement) (figure 53A).

Lorsque les données brutes des foci  $\gamma$ H2AX ont été mesurées 10 minutes après l'irradiation, 5 lignées cellulaires (RACKHAM01, RACKHAM12, RACKHAM39, 02HNA, 13HNG) ont montré un nombre de foci  $\gamma$ H2AX significativement inférieur à celui des témoins radiorésistants ( $p < 0,001$ ) (figure 51A). Lorsque les données spontanées ont été éliminées, cette différence est mise en évidence pour 02HNA et 13HNG et montrée pour 85MA, 102CLB et 103CLB, ce qui suggère une



reconnaissance des CDB plus faible après irradiation pour ces lignées cellulaires (figure 53A).

Dans les témoins radiorésistants, le nombre de foci  $\gamma$ H2AX a diminué de façon continue avec le temps de réparation entre 10 min et 24 h après l'irradiation jusqu'à une valeur de foci  $\gamma$ H2AX qui n'était pas différente de zéro. En revanche, toutes les autres lignées cellulaires testées ont montré des cinétiques de foci  $\gamma$ H2AX différentes (figures 51A et 53A). En particulier, le nombre maximal de foci  $\gamma$ H2AX a été atteint à différents temps post-irradiation et à différentes intensités. RACKHAM01, 02HNA et 85MA atteignent leur maximum à 1h, 101CLB à 4h tandis que les foci  $\gamma$ H2AX sont restés presque constants après l'irradiation pour 103CLB, 102CLB, 01HNG et 13HNG. Toutes les autres lignées cellulaires atteignent leur maximum à 10 min après l'irradiation et diminuent ensuite. À 24 h après l'irradiation, alors que le nombre de foci  $\gamma$ H2AX restants suggérait une réparation complète des CDB, un sous-ensemble de fibroblastes montrait une lente disparition des foci et un nombre de foci  $\gamma$ H2AX restant significativement plus élevé que les témoins non irradiés. C'est le cas des lignées cellulaires 85MA et 01HNG.

Comme des effets biologiques significatifs sont observés dans les cellules présentant plus de 2 foci  $\gamma$ H2AX, le % de ces cellules dans les données détaillées ci-dessus ont été examinées (figure 51B). En accord avec ces données, les lignées cellulaires montrant plus de foci  $\gamma$ H2AX spontanés sont les mêmes que celles montrant le plus grand nombre de cellules avec plus de 2 foci  $\gamma$ H2AX. Dans les cellules non irradiées, ce paramètre a mis en évidence l'instabilité génomique de GM03399, 85MA, 101CLB, 102CLB et 103CLB. Les cellules provenant de patients radiosensibles et/ou radiosusceptible ont montré un pourcentage plus important de cellules présentant plus de 2 foci  $\gamma$ H2AX 24h après l'exposition comparé aux conditions non-irradiées.

Comme l'activité d'ATM est nécessaire pour la formation des foci  $\gamma$ H2AX, nous avons également étudié le nombre de foci nucléaire pATM, mesuré dans les mêmes conditions expérimentales. Les données pATM ont consolidé nos conclusions (figure 52 et 53).

#### **5.2.2.2 Effet radiobiologique du topogramme sur les fibroblastes humains primaires**

Dans tout examen scanographique, un topogramme à faible dose est réalisé afin d'obtenir un repérage du patient. Dans nos conditions, un topogramme standard a

donné lieu à une dose absorbée de 1,1 mGy appliquée 1 minute avant l'acquisition hélicoïdale thoracique. Selon le taux d'induction de CDB très documenté de 37 (+/- 4) CDB par Gy, 1 mGy induirait un taux moyen d'induction de 0,04 CDB/cellule. Bien que cette pré-irradiation ne semble pas avoir d'effet significatif dans les cellules jusqu'à 4 h post-irradiation, le nombre de foci  $\gamma$ H2AX mesuré 24 h après l'irradiation s'est avéré plus élevé dans les lignées cellulaires mutées BRCA1 : 103CLB et 102CLB (figure 54A). L'excès de foci  $\gamma$ H2AX (figure 56A) et le nombre de cellules ayant plus de 2 foci  $\gamma$ H2AX par cellule illustrent mieux cette conclusion (figure 54B). Étant donné que l'activité d'ATM est nécessaire pour la formation des foci  $\gamma$ H2AX, nous avons également étudié le nombre de foci nucléaires pATM, mesuré dans les mêmes conditions expérimentales. Les données pATM ont consolidé nos conclusions (figure 55 et figure 56B)

#### **5.2.2.2.3 Effets radiobiologiques du scanner thoracique sur les cellules épithéliales mammaires humaines primaire**

Les cellules du sein, et notamment les cellules épithéliales mammaires (CEM), sont les modèles cellulaires les plus naturels pour étudier les risques liés à l'exposition au scanner du thorax. Ici, le même protocole expérimental que les fibroblastes a été appliqué aux CEM provenant des mêmes donneurs que 100CLB, 101CLB, 102CLB et 103CLB. Afin d'éviter toute confusion, un "F" pour les fibroblastes et une étiquette "epi" pour les CEM ont été ajoutés à la fin du nom de chaque lignée cellulaire. En ce qui concerne les foci spontanés  $\gamma$ H2AX, aucune différence entre les fibroblastes et les CEM n'a été observée pour 100CLB. En revanche, pour les 101CLB, 102CLB et 103CLB, il y avait une différence énorme entre les deux types de cellules (par exemple : plus de 4 fois plus élevée pour les 101CLB : 0,57 (+/- 0,13) pour les fibroblastes contre (4,48 +/-0,43) pour les CEM) (figure 57).

Dix minutes après une exposition à une seule hélice de scanner thoracique, une augmentation significative du nombre de foci  $\gamma$ H2AX a été observée pour 100CLBepi, 102CLBepi et 103CLBepi. Ces valeurs à 10min post-irradiation, représentaient le maximum de foci  $\gamma$ H2AX atteint durant la cinétique pour ces lignées cellulaires. En revanche, dans les cellules 101CLBepi, le nombre de foci  $\gamma$ H2AX a diminué continuellement avec le temps pour atteindre à 24 heures un taux de foci  $\gamma$ H2AX inférieur à celui des cellules non irradiées ( $p < 0,001$ ) (étoiles rouges figure 57). Les

lignées cellulaires 100CLBepi, 102CLBepi et 103CLBepi ont également montré significativement plus de foci  $\gamma$ H2AX à 24h après irradiation que les témoins non irradiés ( $p < 0,001$ ), (figure 57 et fig 51A). En ce qui concerne les cellules hautement endommagées (CHE), un faible nombre de CHE, voire inexistant, a été observé dans les lignées cellulaires 100CLBepi et 101CLBepi, tandis que le pourcentage de CHE a atteint 20 % dans les lignées 102CLBepi et 103CLBepi 10 min après l'irradiation (figure 58). Seul le processus d'hyper-recombinaison peut être responsable d'une telle production massive de CHE en seulement 10 min. La cinétique de disparition du CHE a suivi approximativement celle des foci  $\gamma$ H2AX.

### **5.2.2.3 Discussion**

#### **5.2.2.3.1 Discussion sur les doses délivrées en scanographie thoracique**

##### **5.2.2.3.1.1 Recueil des données**

Le recueil de données présenté dans le tableau 12 grâce au dispositif IVIsan de la société Fibermetrix ne se veut pas exhaustif. Il a surtout pour but d'avoir des informations pertinentes afin de vérifier que les protocoles expérimentaux reflètent des situations cliniques. Les mêmes difficultés que pour le recueil des données crâne ont été rencontrées pour l'élaboration du tableau 12 et détaillées dans le paragraphe 5.1.2.5. Afin de mieux refléter les données recueillies dans les trois centres, les valeurs concernant les deux rapports IRSN sont moyennées entre les protocoles thorax avec et sans injection de produit de contraste.

##### **5.2.2.3.1.2 Discussion sur les indicateurs dosimétriques**

Concernant les PDL, on observe une faible baisse des valeurs moyennes entre les rapports de l'IRSN de 2007 et de 2012 contrairement à celle observée pour les examens crâne. Étant donné que les  $CTDI_{vol}$  sont relativement bas pour des scanners thorax et que le PDL résulte de la multiplication du  $CTDI_{vol}$  par la longueur explorée, il est normal que cette baisse soit moins marquée que pour les examens crâne. Cette légère baisse peut être due aux évolutions technologiques des machines au niveau de la réduction de dose et à une amélioration de l'optimisation des protocoles. Le même biais que pour les examens crâne existe concernant l'intégration de la radioprotection des patients dans les pratiques des centres impliqués dans cette étude et la non

représentativité possible au niveau national de ces données. Les chiffres des trois centres sont plus bas que les rapports IRSN. Nos données sont plus récentes que celles des deux rapports IRSN. La modulation de la dose (à la baisse) s'est améliorée et est particulièrement efficace pour la zone pulmonaire compte-tenu de la faible densité de cette région corporelle (côtes et poumons remplis d'air). Concernant les valeurs de PDL expérimentales, elles sont beaucoup plus basses que les valeurs cliniques. Ceci s'explique par la longueur explorée qui est plus grande en clinique alors qu'elle est limitée à 15cm sur notre fantôme. Cette explication est confirmée par le fait que le  $CTDI_{vol}$  expérimental est plus élevé que les  $CTDI_{vol}$  cliniques.

Les expériences radiobiologiques ont été réalisées dans le centre 2. Le  $CTDI_{vol}$  expérimental est légèrement plus élevé que le  $CTDI_{vol}$  de ce dernier. Cela peut s'expliquer par la densité uniforme et plus importante du fantôme et donc une modulation de la dose à la baisse moins efficace. Pour le même centre, les valeurs de PDL peuvent grandement varier (voir  $PDL_{max}$ ) et être dix fois supérieures au PDL moyen (centre 3). Cependant, ces valeurs ne dépassent pas forcément les NRD compte-tenu du fait qu'ils sont déterminés par acquisition et non sur la totalité des examens. Ces valeurs maximales sont surtout atteintes à cause d'hélices répétées qui peuvent atteindre 8 (rapport IRSN PRP-HOM-2013-12). Pour les mêmes raisons que pour les examens crâne, le rapport 25<sup>ème</sup>/75<sup>ème</sup> centile des protocoles expérimentaux est systématiquement inférieur à celui des protocoles cliniques. Concernant les  $CTDI_{vol}$ , une baisse est observée entre le rapport de l'IRSN 2007 et les données des centres 1, 2 et 3, probablement pour les mêmes raisons que celles avancées pour les PDL. Cependant, le  $CTDI_{vol}$ , peut parfois atteindre 25.2 mGy dans certains cas, par exemple pour des patients corpulents ( $CTDI_{max}$  centre 1). Concernant la dose absorbée, les doses aux fibroblastes et aux cellules épithéliales mammaires sont légèrement plus faibles que les doses « sein » calculées dans le rapport de l'IRSN. En revanche, elles correspondent aux doses calculées pour des protocoles thorax optimisés plus récent<sup>475</sup>, ce qui valide nos modèles expérimentaux.

**Il est important de noter, d'après cette analyse non exhaustive des doses délivrées en scanographie thoracique, que nos conditions expérimentales se situent, au niveau dosimétrique, dans la partie basse des valeurs observées dans ce type d'examen.**

### **5.2.2.3.2 Discussion sur les effets radiobiologiques des expositions scanographiques thoraciques**

Plusieurs études radiobiologiques ont étudié le risque radioinduit des scanners, en particulier sur les lymphocytes<sup>413</sup>. Ici, pour la première fois à notre connaissance, nous avons exposé des fibroblastes et des cellules épithéliales mammaires primaires dans des conditions standard d'un scanner thoracique en considérant l'influence de la radiosensibilité et/ou de la radiosusceptibilité individuelle et la nature du tissu imagé. En parallèle, la mesure de la dose absorbée a été réalisée avec un dosimètre ponctuel à fibre optique scintillante développé par la société Fibermetrix (Strasbourg, France)<sup>449,450</sup>. Cette double approche novatrice contraste avec les études précédentes puisque la dosimétrie a généralement été réalisée avec des doses absorbées calculées et/ou avec les indicateurs dosimétriques du scanner, c'est-à-dire le CTDI et/ou le PDL. Ces derniers ne sont pas nécessairement précis et représentatifs de la dose aux cellules.

#### **5.2.2.3.2.1 Cassures double-brin spontanées**

La présence de foci  $\gamma$ H2AX spontanés peut refléter la présence de CDB spontanées dues à des facteurs exogènes (stress environnemental et/ou antécédents radiologiques) d'une part, et d'autre part, à une altération du maintien du génome liée à l'hyper-recombinaison. Ce phénomène est généralement rencontré chez les individus ayant de prédisposition au cancer comme les patients mutés BRCA1. Tout d'abord, ce taux de  $\gamma$ H2AX spontanés par cellule s'est avéré significativement plus élevé chez sept patients par rapport au patient témoin radiorésistant 100CLB. Cette observation, notamment pour GM03399, 85MA, 101CLB, 102CLB et 103CLB, est en accord avec les observations précédentes et avec le rôle biologique des protéines ATM, p53, BRCA2 et BRCA1 dans le maintien du génome. Cette différence et cette explication dans pour les foci  $\gamma$ H2AX spontanés est particulièrement vraie pour les cellules épithéliales mammaires (CEM), dans lesquelles le contrôle du cycle cellulaire doit être encore plus efficace en raison de la tendance générale des cellules épithéliales à proliférer.

#### **5.2.2.3.2 Cassures double-brin radioinduites**

Nos résultats suggèrent que les facteurs individuels des fibroblastes et des CEM peuvent provoquer des réponses biologiques différentes lorsque les foci  $\gamma$ H2AX et pATM sont pris en compte. Comme ces biomarqueurs reflètent la fonctionnalité de la reconnaissance et de la réparation des CDB, nos données fournissent des indices selon lesquels, même pour une exposition à une seule hélice de scanner thoracique (correspondant ici à 14,4 mGy), la dose biologique peut être différente de la dose physique (figure 51). Le nombre de foci  $\gamma$ H2AX dans les lignées cellulaires 01HNG et 85MA s'est avéré significativement différent 24h après exposition, qu'en conditions non irradiées (valeur  $p < 0,05$ ). Rappelons que la lignée cellulaire 01HNG est connue pour être hypersensible aux faibles doses (phénomène HFD)<sup>476</sup> et que le patient 85MA souffrait du syndrome de Li-Fraumeni (mutations hétérozygotes p53). Toutes ces données sont cohérentes avec un impact significatif du facteur individuel sur la réponse finale aux rayonnements ionisants, même dans des conditions de scanographie. En ce qui concerne les cellules épithéliales mammaires, une différence significative a été observée entre les lignées cellulaires épithéliales testées ici et fibroblastes d'un même donneur, ce qui confirme une fois de plus la forte influence du facteur tissulaire sur la réponse aux rayonnements ionisants (figure 57).

#### **5.2.2.3.3 Effet du topogramme**

L'effet du topogramme qui correspond ici à un schéma de dose de 1,1 mGy + 1 min + 14,4 mGy par rapport à 14,4 mGy seul suggère un effet de répétition de dose dans les lignées cellulaires 102CLB et 103CLB mutées BRCA1 (figure 54). En effet, si la différence dans le nombre de foci  $\gamma$ H2AX par cellule était faible avec une seule exposition hélicoïdale, elle devient significative après l'utilisation du topogramme ( $p < 0,05$ ). Un phénomène similaire a été observé dans des conditions de dépistage par mammographie avec une succession de deux doses faibles (2 mGy + 3 min + 2mGy)<sup>28</sup>. Ces résultats ont été interprétés en considérant que quelques minutes entre deux doses ne sont pas suffisantes pour permettre une reconnaissance et une réparation complète des CDB. En conséquence, au début de la deuxième dose, la chromatine est plus décondensée, ce qui favorise l'induction et l'addition de CDB (effet LORD pour *LOw and Repeated Dose effect*)<sup>28</sup>. Cependant, dans le cas des cellules radiosensibles et ou radiosusceptible, cette condition renforce le processus d'hyper-recombinaison qui est responsable de CDB endogène supplémentaires (effet LADI

pour *Low-dose-induced Additional CDB effect*)<sup>28</sup>. Il est intéressant de noter que l'effet LADI a été observé dans les cellules épithéliales mammaires provenant de patients à haut risque de cancer, y compris les femmes mutées BRCA1. De toute évidence, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre les conséquences de ces effets de répétition de dose.

#### **5.2.2.3.2.4 Les cellules hautement endommagées (CHE)**

Des cellules comportant plus de 15 foci  $\gamma$ H2AX ont été observées et considérées comme des CHE (figure 58). La contre-coloration DAPI a indiqué que la forme morphologique des CHE était clairement différente de celle des cellules apoptotiques. De plus, l'augmentation des taux de CHE rapportée ici ne peut pas correspondre à la proportion de cellules qui seraient en phase S, et alors que, à l'opposé d'un effet dépendant de la réplication, les taux de CHE augmentent avec la dose. Une interprétation plus plausible serait que les CHE contiennent un certain nombre de CDB mal réparées qui, malgré leur nombre, permettent aux cellules de survivre. Encore une fois, une telle interprétation serait cohérente avec l'observation que les CHE sont beaucoup plus nombreuses dans les cellules 102CLB et 103CLB mutées BRCA1 qui sont supposées être plus instables par rapport aux cellules 100CLB témoins radiorésistantes. Des études moléculaires et cellulaires supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre le lien potentiel entre les CHE, la létalité cellulaire et la carcinogenèse, notamment chez les patients dont les cellules présentent une hyper-recombinaison.

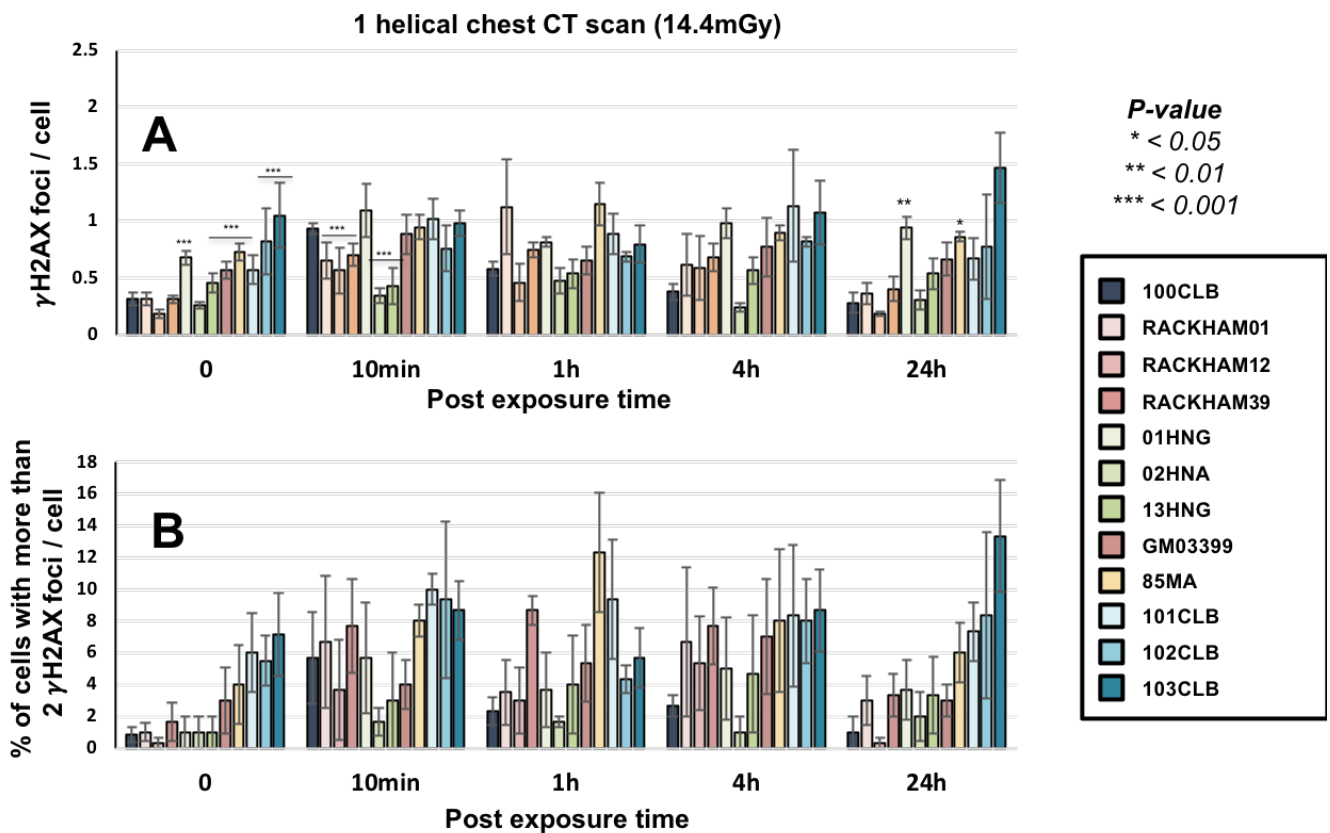
#### **5.2.2.3.2.5 Conclusion**

Ce travail a été effectué dans des conditions exactes de scanographie thoracique et avec des modèles cellulaires pertinents. Il met en évidence l'existence de dommages de l'ADN radioinduits et quantifiables grâce aux données bien documentées des foci  $\gamma$ H2AX et pATM. En considérant les données des foci  $\gamma$ H2AX, la réponse aux radiations est exacerbée par la présence de certaines mutations génétiques responsables de la radiosensibilité et/ou de la radiosusceptibilité. Cependant, une cohorte plus importante est nécessaire pour consolider ces conclusions. Il faut souligner ici que l'absence de biomarqueur spécifique à la radiosusceptibilité est l'une des limites majeures des études visant à évaluer le risque potentiel d'expositions scanographiques. Même si la mauvaise réparation des CDB, l'hyperrecombinaison et

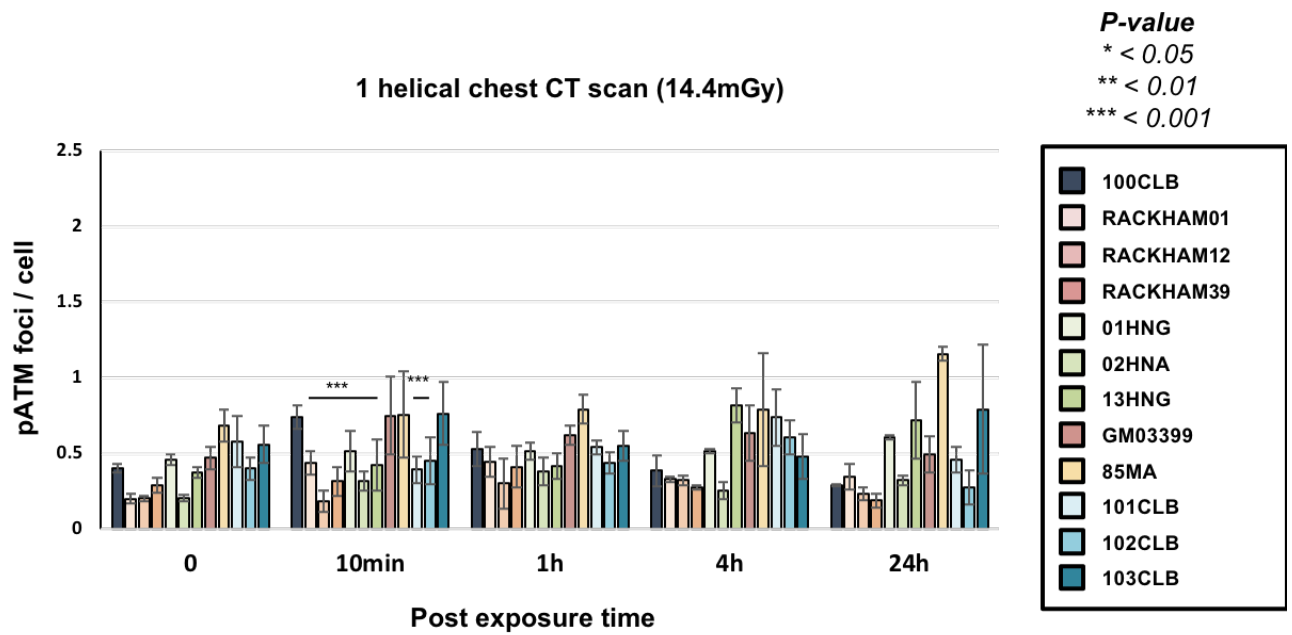
l'instabilité génomique sont systématiquement associées à la prédisposition au cancer, il faut un biomarqueur fiable qui serait applicable dans les conditions scanographiques. Néanmoins, il convient de noter que si, pour une dose physique donnée, le nombre de CDB reconnues et/ou résiduelles diffère sensiblement d'un patient à un autre, cela devrait suffire pour intégrer ces résultats dans la discussion sur la justification des examens, puisque certains patients asymptomatiques à haut risque génétique peuvent être exposés à un scanner thoracique. Il est évident, là encore, qu'un certain nombre d'études supplémentaires sont nécessaires pour quantifier le risque pour un statut génétique donné. Toutefois, les données présentées ici fournissent de nouveaux indices selon lesquels, même pour une exposition à faible dose appliquée lors d'un examen thoracique, la réponse biologique aux rayonnements ionisants peut être différente d'un patient et d'un tissu à un autre et doit être prise en compte.



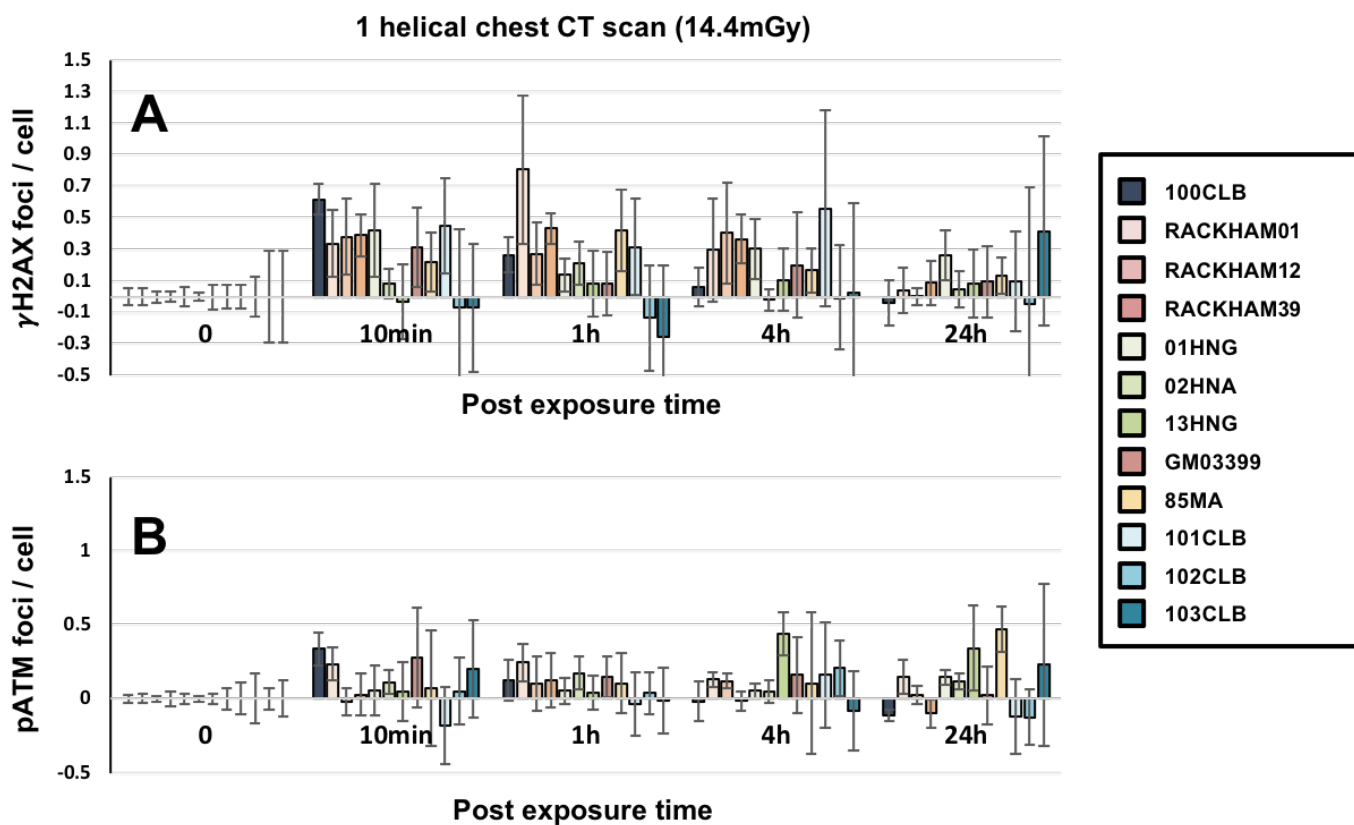
### 5.2.2.3.2.6 Figures expositions scanographiques thoraciques<sup>465</sup>



**Figure 51 :** Cinétique des foci  $\gamma$ H2AX dans les fibroblastes après un scanner thoracique aux temps indiqués après exposition ( $t_0$  = non irradié) (**A**). Pourcentage moyen de cellules avec plus de 2 foci après un scanner thoracique (**B**) Les barres d'erreur indiquent l'écart type des moyennes des 3 expériences indépendantes. \* Les étoiles pour les conditions non irradiées et 10min après exposition correspondent à une différence statistiquement significative par rapport au témoin radiorésistant. Les étoiles à 24 heures après exposition correspondent à une différence statistiquement significative par rapport aux conditions non irradiées.

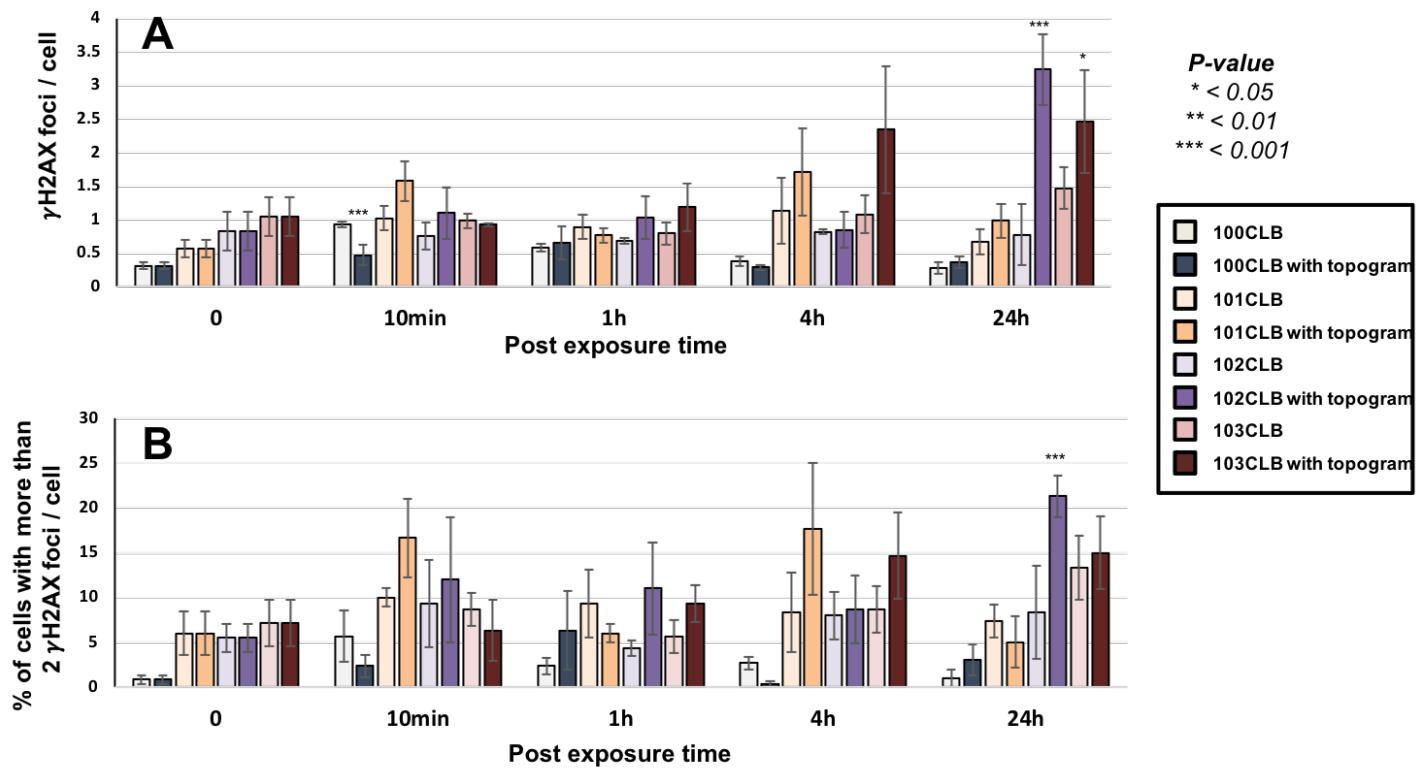


**Figure 52 :** Cinétique des foci pATM dans les fibroblastes après un scanner thoracique aux temps indiqués après exposition ( $t_0$  = non irradié). Les barres d'erreur indiquent l'écart type des moyennes des 3 expériences indépendantes. \*Les étoiles à 10 minutes après exposition correspondent à une différence statistiquement significative par rapport au témoin radiorésistant.

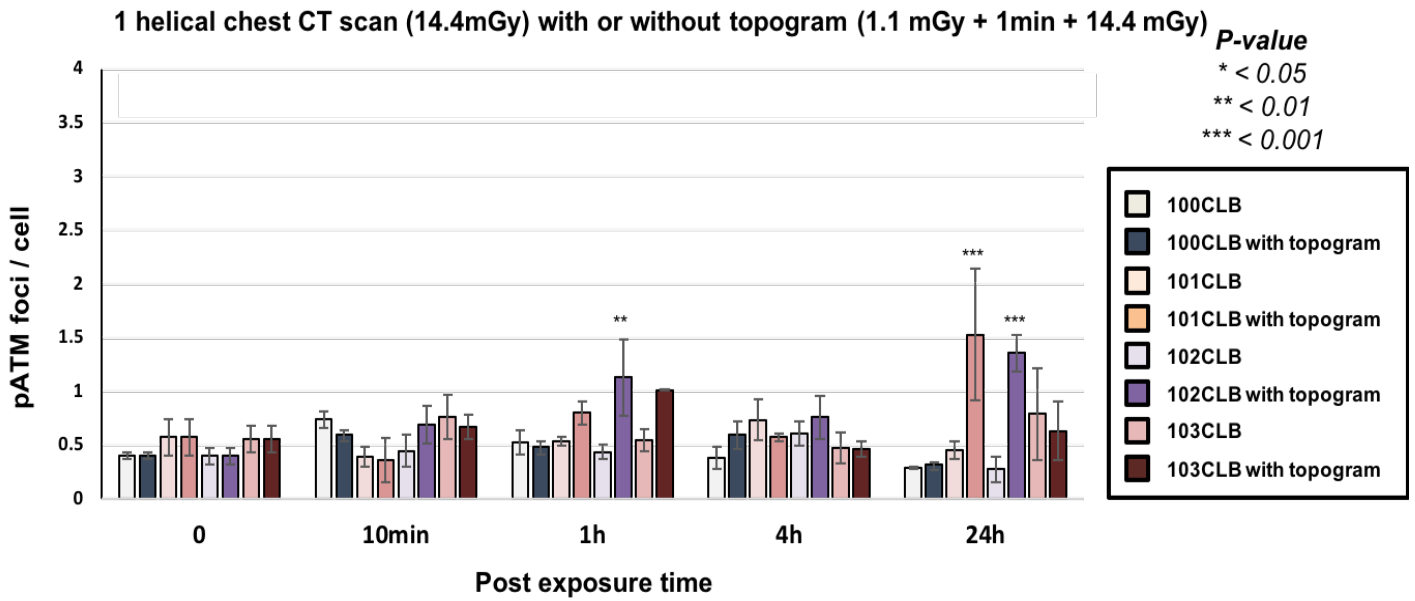


**Figure 53 :** Cinétique de l'excès de foci  $\gamma$ H2AX (**A**) et pATM (**B**) dans les fibroblastes après un scanner thoracique aux temps indiqués après exposition ( $t_0$  = non irradié). Les données ont été obtenues par soustraction des données spontanées pour chaque lignée. Les barres d'erreur indiquent l'écart type des 3 expériences indépendantes.

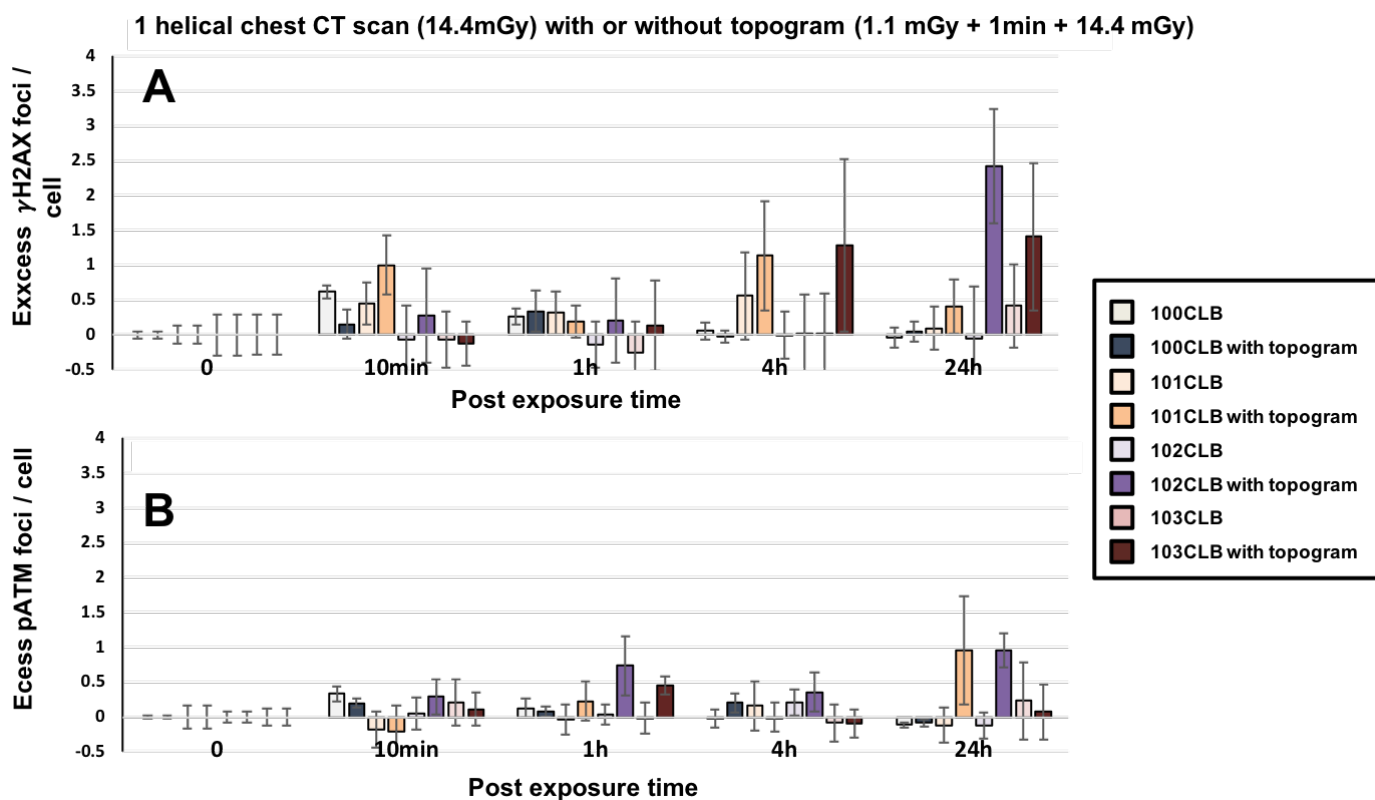
1 helical chest CT scan (14.4mGy) with or without topogram (1.1 mGy + 1min + 14.4 mGy)



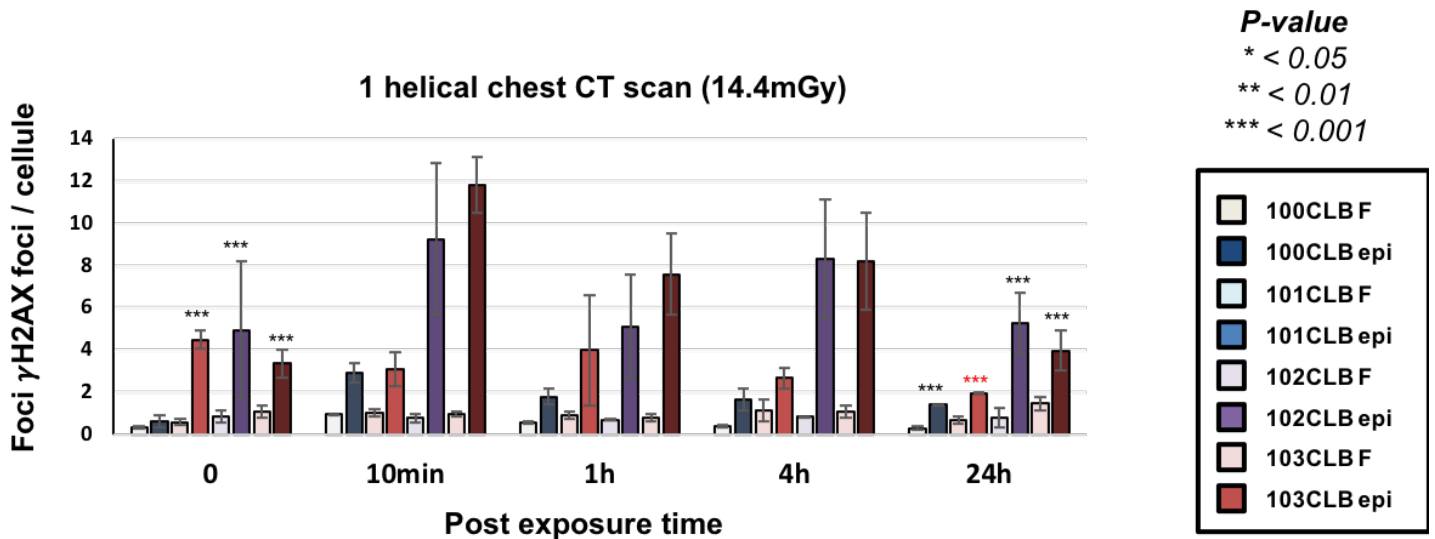
**Figure 54 :** Cinétique des foci  $\gamma$ H2AX dans les fibroblastes après un scanner thoracique avec ou sans topogramme (A) aux temps indiqués après exposition ( $t_0$  = non irradié). Les données montrent le pourcentage moyen de cellules avec plus de 2 foci après un scanner thoracique avec ou sans topogramme (B) Les barres d'erreur indiquent l'écart type des moyennes des 3 expériences indépendantes. \*Les étoiles correspondent à une différence statistiquement significative entre les conditions avec ou sans topogramme pour les mêmes lignées cellulaires.



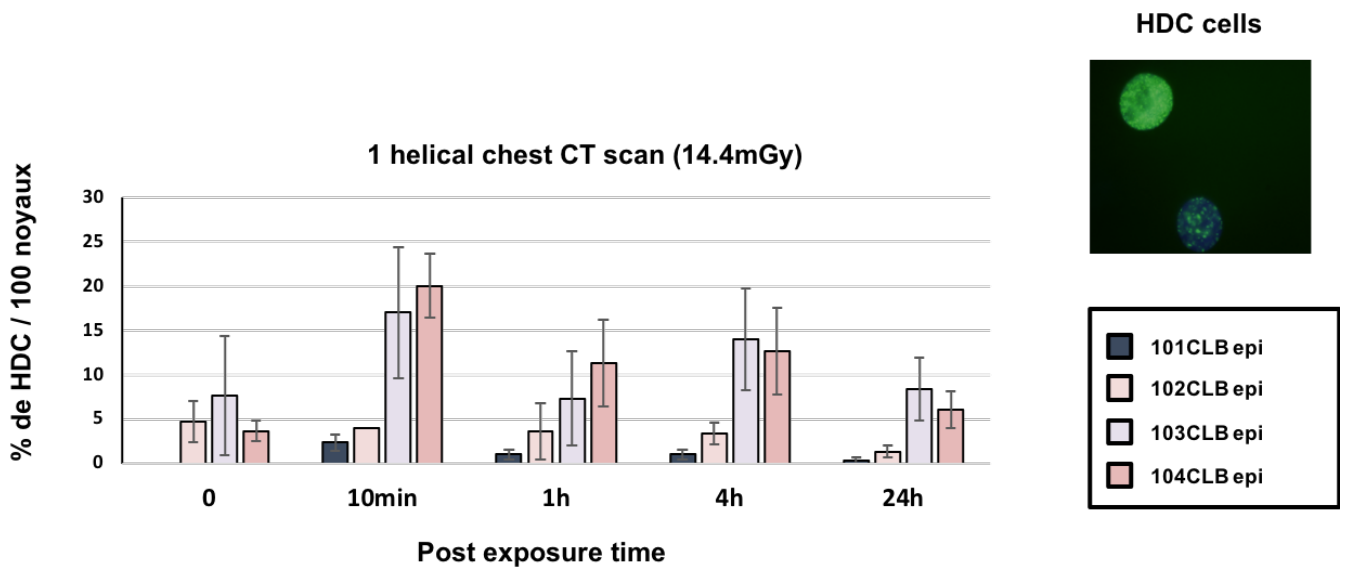
**Figure 55 :** Cinétique des foci de pATM dans les fibroblastes après un scanner thoracique avec ou sans topogramme aux temps indiqués après exposition ( $t_0$  = non irradié). Les barres d'erreur indiquent l'écart type des moyennes des 3 expériences indépendantes. \*Les étoiles correspondent à une différence statistiquement significative entre les conditions avec ou sans topogramme pour les mêmes lignées cellulaires.



**Figure 56** : Cinétique de l'excès de foci  $\gamma$ H2AX (**A**) et pATM (**B**) dans les fibroblastes après un scanner thoracique aux temps indiqués après exposition ( $t_0$  = non irradié). Les données ont été obtenues par soustraction des données spontanées pour chaque lignée. Les barres d'erreur indiquent l'écart type des moyennes des 3 expériences indépendantes.



**Figure 57 :** Cinétique des foci  $\gamma$ H2AX dans les fibroblastes (F) (couleurs claires) et dans les cellules épithéliales mammaires (épi/CEM) (couleurs foncées) après un scanner thoracique aux temps indiqués après exposition ( $t_0$  = non irradié). Les barres d'erreur indiquent l'écart type des moyennes des 3 expériences indépendantes. \*Les étoiles pour les conditions non irradiées correspondent à une différence statistiquement significative entre les fibroblastes et les CEM pour les mêmes donneurs. \*les étoiles à 24h après l'exposition correspondent à une différence statistiquement significative avec les conditions non irradiées pour les mêmes tissus et lignées cellulaires. Les étoiles rouges correspondent à une différence statistiquement significative inférieure aux conditions non irradiées.



**Figure 58 :** Cinétique des pourcentages de cellules hautement endommagées (CHE ou HDC pour Highly damaged cells) (>15 foci) dans les cellules épithéliales mammaires après un scanner thoracique aux temps indiqués après exposition ( $t_0$  = non irradié). Les barres d'erreur indiquent l'écart type des moyennes des 3 expériences indépendantes.



## **6 Discussion générale**

### **6.1 Les phénomènes radiobiologiques spécifiques des faibles doses**

#### **6.1.1 Généralités**

On ne pouvait pas aborder l'interprétation des données radiobiologiques issues d'expositions scanographiques sans tenir compte de certains phénomènes radiobiologiques spécifiques des faibles doses. Parmi eux figurent l'hypersensibilité aux faibles doses, la réponse adaptative et l'hormésis<sup>302,303</sup>. Il faut cependant noter que les phénomènes de voisinage (effet bystander et effet abscopique) sont aussi souvent cités dans cette catégorie<sup>1</sup>. Cependant, ils sont plutôt la conséquence d'une forte dose de radiation même s'ils peuvent, indirectement, produire des effets équivalents à des doses faibles<sup>477</sup>. Nous ne les aborderons donc pas dans nos interprétations, d'autant plus que notre laboratoire n'a pas encore fini d'accumuler des données sur ces phénomènes afin d'apporter une réponse claire quant à leurs mécanismes intrinsèques et leurs liens avec le modèle du transit d'ATM<sup>122,478</sup>.

#### **6.1.2 Hypersensibilité aux faibles doses et expositions scanographiques**

Contrairement à la réponse adaptative et à l'hormésis qui sont le sujet privilégié d'une communauté de scientifiques très active publiant régulièrement des revues sur le sujet depuis les années 50, l'hypersensibilité aux faibles doses est un phénomène mis en évidence plus récemment (à la fin des années 80) et qui a mobilisé un nombre de groupes de recherche plutôt réduit<sup>384,390,391</sup>. L'hypersensibilité aux faibles doses décrit une discontinuité de la relation dose-effet d'abord observée en courbes de survies puis étendue à d'autres paramètres comme le nombre de micronoyaux, le nombre de CDB non réparées ou le nombre de séquences mal réparées<sup>443,479,480</sup>. A la fin des années 90, alors que certains évoquaient la possibilité d'artéfacts techniques pour expliquer ce phénomène, d'autres tentaient de l'exploiter par la mise au point de radiothérapie fractionnée avec des sessions de 0.1 à 0.5 Gy<sup>481</sup>. Dans les, deux cas, ce phénomène constituait véritablement une énigme et la variété des modèles cellulaires et des protocoles expérimentaux était trop importante pour dégager une explication mécanistique unique<sup>384</sup>. En 2013, j'ai participé en tant que co-auteur à une première publication du laboratoire sur le sujet<sup>390</sup> où une revue systématique de la littérature sur les conditions d'irradiation (dose, temps d'irradiation et débit de dose d'irradiation)

nécessaires à l'observation du phénomène fut effectuée<sup>390</sup>. Il apparut que l'hypersensibilité aux faibles doses pouvait être observée quel que soit le débit de dose et la dose, du moment que l'irradiation ne dure pas plus de  $23 \pm 5$  s<sup>390</sup>. Pour expliquer moléculairement ce phénomène, nous avons dû introduire la notion de *reconnaissance* des CDB par les systèmes de signalisation et de réparation de l'ADN<sup>390</sup>. Ainsi, en une vingtaine de secondes, aucune CDB ne pouvait être reconnue pendant l'irradiation : en courbes de survie, on observait ainsi une baisse de la survie cellulaire (on parlait alors de *radiosensibilité aux faibles doses ou HFD*). Par contre, si la dose était appliquée sur une plus grande période de temps, les CDB induites en début d'irradiation pouvaient alors être reconnues progressivement et donc éventuellement être réparées : la courbe de survie remontait alors (*phénomène dit de résistance radioinduite ou IRR*). L'analyse de toutes les données de la littérature ainsi que l'ajout des nôtres fournirent une courbe reliant la dose et le débit de dose pour un effet maximal HFD (figure 2A de Thomas et al., 2013<sup>390</sup>). Pour des conditions d'irradiation d'un examen scanographique (dose de l'ordre de 20 à 40 mGy et débit de dose de l'ordre de 100 mGy/min), le phénomène HFD paraissait tout-à-fait possible. En parallèle, en 2016, afin de donner une explication biologique au modèle LQ, base de la radiobiologie cellulaire, notre laboratoire proposait également une explication moléculaire unifiée pour HFD et IRR: plus la dose est faible, moins les monomères d'ATM sont nombreux dans le cytoplasme et moins ils pourront diffuser dans le noyau et reconnaître des CDB. Ce phénomène HFD est d'autant plus marqué pour les cellules de groupe II (retard de transit). A l'inverse, si la dose augmente, le nombre de CDB augmente (plusieurs dizaines par Gy) mais le nombre de monomères d'ATM augmente plus vite (plusieurs milliers à dizaines de milliers de molécules par Gy). Ainsi, une légère augmentation de la dose (ex : de 0.2 Gy à 0.5 Gy) suffit à refaire remonter la courbe de survie (phénomène IRR). L'explication de ce phénomène d'hypersensibilité aux faibles doses à travers le modèle d'ATM reste encore aujourd'hui incontestée<sup>466</sup>. De façon intéressante, cette explication permet aussi de mieux comprendre pourquoi les cellules de patients de radiosensibilité de groupe II (c'est-à-dire avec un retard de transit d'ATM) montrent préférentiellement le phénomène HFD. Ainsi, il était donc important de considérer le phénomène HFD, dépendant du facteur individuel, dans l'évaluation du risque lié aux examens scanographiques et ce d'autant plus qu'à une dose où HFD est maximal, l'effet peut être équivalent à celui produit par une dose 5 à 10 fois plus forte. Ainsi, pour un

phénomène HFD observé à 40 mGy pour un scanner cérébral, on peut observer un risque équivalent à une exposition à 200-400 mGy pour un patient HFD-positif.

**A l'exception des travaux de Beels<sup>408</sup>, le phénomène HFD est rarement considéré pour l'évaluation du risque lié aux examens scanographiques.**

### **6.1.3 Hormésis, réponse adaptative et expositions scanographiques**

Dans le cadre de notre revue générale de la bibliographie, nous avons constaté que les termes de réponse adaptative et d'hormésis étaient utilisés sans rigueur ni définition stricte. Pire, une analyse sémantique des deux termes nous indiquait que l'hormésis qui vient du grec hormes (stimuli) suggérait l'utilisation d'une première dose « stimulante » alors que le terme de « réponse adaptative » était utilisé préférentiellement pour décrire un phénomène qui s'est établi progressivement sur le long terme, à travers l'évolution<sup>303</sup>. La diversité des protocoles expérimentaux n'a pas facilité non plus notre analyse d'autant que la communauté de scientifiques qui publiait le plus dans le domaine extrapolait très fréquemment à l'homme les données sur les micro-organismes et les animaux alors que les données humaines sur l'hormésis et la réponse adaptative ne représentaient qu'une contribution très minoritaire. La difficulté d'établir des modèles d'explication unifiés et cohérents était d'autant plus grande que le facteur individuel n'a jamais été vraiment considéré non plus pour ces deux phénomènes.

La première étape d'une analyse faite en parallèle sur la réponse adaptative<sup>302</sup> et l'hormésis<sup>303</sup> a donc consisté à répertorier tous les protocoles expérimentaux permettant d'observer ces phénomènes. C'est à ce stade qu'il est apparu clair que la réponse adaptative impliquait deux irradiations successives alors que l'hormésis était décrit comme une fonction de la dose ou du débit. Dans un deuxième temps, il apparut que la gamme des doses avec laquelle on observait la réponse adaptative ou bien l'hormésis était différente. En effet, la dose permettant l'hormésis correspond généralement à une dose (autour de 25 mGy) n'induisant pas ou peu de CDB mais rendant encore possible la diffusion de plusieurs milliers de monomères ATM dans le noyau<sup>303</sup>. Dans une troisième étape, nous devons répondre à la question (rarement

posée dans la littérature) : quelle est l'influence de la radiosensibilité individuelle sur ces phénomènes dans le cadre d'expositions scanographiques?

Pour l'hormésis, notre hypothèse est que l'apport de nouveaux monomères d'ATM dans le noyau permettrait la reconnaissance de CDB spontanées dues au stress oxydatif permanent puisqu'une telle dose ne crée pas ou peu de CDB radioinduites : les cellules radiorésistantes de groupe I ayant un faible taux de stress oxydatif pourraient alors bénéficier d'un tel phénomène. Toutefois, l'hormésis ne serait observé qu'à condition que les cellules montrent des cassures spontanées de l'ADN : sans la réduction du taux de cassures, il est très probable que l'effet hormétique ne soit pas mesurable. A l'inverse, pour la majorité des cellules de groupe II, le retard de transit d'ATM est tel que l'apport de monomères d'ATM ne suffit pas à diminuer suffisamment le nombre de CDB<sup>303</sup>. Ainsi, l'hormésis, contrairement au phénomène HFD ne devrait être observé que sur certaines cellules radiorésistantes<sup>303</sup>. Ainsi, en termes mécanistiques, l'hormésis peut être défini comme étant produit par une dose ne créant pas de CDB mais qui apporte suffisamment de monomères d'ATM dans le noyau pour réduire significativement le stress oxydatif présent dans les cellules. On verra plus loin la traduction de cette définition quand on considère le débit de dose. Mais si l'hormésis n'est visible que dans une sous-population de personnes de groupe I, pour quelles raisons ces personnes subiraient-elles une exposition scanographique ? A l'exception d'examens diagnostiques à la suite de traumatismes accidentelles, par définition rarement répétés, où l'urgence vitale immédiate prime sur le risque radioinduit, une exposition scanographique sur une personne de groupe I peut éventuellement s'effectuer si celle-ci souffre d'un cancer lié à d'autres facteurs que le statut lié au transit d'ATM (ex cancers induits comme les cancers professionnels ou ceux liés au tabac ou à l'environnement). Mais là encore, du fait d'un probable taux de stress spontané très élevé dû à l'agent inducteur de cancer, il est très peu probable qu'un effet hormétique puisse être causé par une exposition scanographique. Il faudra donc documenter d'avantage les conditions d'expositions scanographiques afin de répondre plus complètement à cette question.

En ce qui concerne la réponse adaptative, nous avons pu la définir en termes opérationnels<sup>302</sup> : tout phénomène radiobiologique qui suit la succession d'une dose  $d_{RA}$ , suivie d'un intervalle de temps  $\Delta_{RA}$  suivie d'une dose  $D_{RA}$  qui serait inférieure à l'effet de la seule dose  $D_{RA}$  ( $d_{RA} + \Delta_{RA} + D_{RA} < D_{RA}$ ). Pour que la réponse adaptative soit observée chez l'homme nous avons déterminé qu'il fallait que  $d_{RA}$  soit compris entre

0.001 et 0.5 Gy, que  $\Delta_{RA}$  soit compris entre 2 et 24 h et que  $D_{RA}$  soit compris entre 0.1 et 5 Gy<sup>302</sup>. A l'évidence, ces conditions ne sont pas celles d'un examen scanographique isolé même avec la succession d'une double hélice. Pour remplir les conditions de la succession d'une faible dose puis d'une forte dose, on peut éventuellement évoquer un scanner de repositionnement pour mieux localiser la tumeur avant une session de radiothérapie qui donnerait la forte dose. Mais là encore, il faudrait admettre que la dose liée au scanner diminue l'efficacité anti-tumorale de la dose délivrée en radiothérapie. Nous sommes donc loin des conditions d'irradiation appliquées en routine où la réponse adaptative serait présentée comme bénéfique<sup>302</sup>. Tel qu'il l'a été défini dans la littérature, le phénomène de réponse adaptative ne peut être évoqué dans l'évaluation du risque lié aux examens scanographiques. Une fois encore, il faudra documenter d'avantage les conditions d'expositions scanographiques afin de répondre plus complètement à cette question.

**Ainsi, nos conclusions sont loin de l'enthousiasme de certains groupes de recherche à présenter l'hormésis ou la réponse adaptative comme « bénéfiques » à travers les expositions scanographiques. Seul, le phénomène d'hypersensibilité aux faibles doses serait à considérer dans l'évaluation du risque lié aux expositions scanographiques. Mais serait-il bénéfique ou délétère ?**

#### **6.1.4 Effets bénéfiques ou délétères ?**

Une fois mieux définis et mieux compris, les 3 phénomènes spécifiques des faibles doses nous permettent désormais d'envisager un modèle général d'explication basé sur le transit radioinduit de la protéine d'ATM et d'introduire alors la notion de facteur individuel. Toutefois, à partir des revues effectuées<sup>302,303</sup>, il apparut que la notion de bénéfice qui accompagnait les études de ces trois phénomènes pouvait biaiser les interprétations et les conclusions.

L'hormésis, dont la popularité date d'un ouvrage de l'américain Thomas Luckey publié dans les années 80, a été présenté historiquement comme le phénomène radiobiologique décrivant l'effet bénéfique des faibles doses de radiations. Comme on l'a montré<sup>303</sup>, le paramètre le plus couramment utilisé dans les études moléculaires et cellulaires pour démontrer l'hormésis radioinduit était la capacité des cellules à

proliférer. Pour des irradiations à faibles doses de micro-organismes, ce domaine peut intéresser certains groupes de recherche. Par contre, si on passe aux cellules humaines, une prolifération plus importante après irradiation évoque plus une transformation cellulaire et/ou une perte de contrôle du cycle cellulaire, ce qui ne peut pas être considéré comme bénéfique. Bizarrement, cette question n'avait jamais été posée en ces termes dans les nombreuses publications traitant de l'hormésis. Ainsi, la notion de *eustress* (un stress positif) perd ici toute sa signification.

On peut raisonner de la même façon avec la réponse adaptative qui, en plus d'un protocole d'irradiation peu probable dans la réalité ( $d_{RA} + \Delta_{RA} + D_{RA}$ ) ne s'observe que si  $D_{RA}$  est de l'ordre du Gy, c'est-à-dire soit létale, soit transformante. Ainsi, nos revues sur l'hormésis et la réponse adaptative ont permis de mieux situer les conditions d'observation de ces deux phénomènes mais aussi de mieux cerner également la nature des interprétations qui leur étaient liées.

Loin des données biologiques, l'analyse des données épidémiologiques liées à l'hormésis implique un tout autre paramètre que la prolifération : le risque de cancer ou l'excès de risque. D'ailleurs, à ce stade, on comprend mal comment une plus grande prolifération cellulaire dans le cadre d'études biologiques pourrait expliquer un effet bénéfique comme la baisse du risque de cancer dans le cadre d'études épidémiologiques<sup>303</sup>. Dans le cas d'un effet hormétique, le risque diminue voire devient négatif (donc protecteur contre le cancer). C'est principalement ce que l'on observe dans certaines études liées aux survivants des bombardements d'Hiroshima et de Nagasaki. Malheureusement, ces études ne sont pas nombreuses et la méthodologie avec laquelle ces données ont été obtenues requiert toute la prudence nécessaire : un approfondissement de l'analyse de ces données serait souhaitable avec les nouveaux éléments que nous apportons ici. Nous aborderons également ce point dans le chapitre suivant.

Le lien entre bénéfice et hypersensibilité aux faibles doses est tout aussi difficile à soutenir. Pourtant certains auteurs l'ont développé sous cet angle. Comme on l'a dit plus haut, l'hypersensibilité aux faibles doses a été observée en courbe de survie comme une baisse drastique de la survie clonogénique<sup>482</sup>, en immunofluorescence  $\gamma$ H2AX comme une augmentation significative du nombre de CDB non-réparées<sup>479</sup>, en cytogénétique comme une augmentation significative du nombre de micronoyaux<sup>480</sup>, ou en technique HPRT comme un excès de mutations géniques<sup>443</sup>. Cette dernière observation montre que l'hypersensibilité aux faibles est associée à un excès de mort

cellulaire mais aussi à un excès de transformation cellulaire. Or, comme ces observations ont d'abord été faites sur les tumeurs, la croyance que ce phénomène n'était spécifique que pour ce type cellulaire a fait beaucoup pour le considérer comme bénéfique. La plus populaire des interprétations dans ce sens était basée sur l'hypothèse que l'apoptose pouvait cibler préférentiellement les cellules dites *pré-tumorales* et les cellules les plus radiosensibles, ce qui faisait baisser la survie très rapidement. Cette explication, avancée notamment dans le cadre du rapport conjoint de l'Académie des Sciences et de l'Académie de Médecine<sup>483</sup> n'est pas acceptable pour les raisons suivantes :

- Les travaux de Slonina et al.<sup>391</sup> ont montré que l'hypersensibilité aux faibles doses est aussi observée sur des fibroblastes de peau qui, en plus, ne font pas d'apoptose
- Toutes les tumeurs ne font pas d'apoptose (ex : notamment celles portant des mutations de p53) et toutes les tumeurs HFD positives ne font pas nécessairement d'apoptose<sup>484</sup>
- Quantitativement, l'intensité maximale du phénomène HFD ne dépasse pas les 25% de réduction de survie. Or, comment un phénomène basé sur une mort massive peut-il être limité à 25% de réduction de survie ? De plus, si la population cellulaire est composée de cellules pré-tumorales, pourquoi cette population resterait toujours limitée à 25<sup>485</sup>;
- Enfin, d'un point de vue physique, comment l'irradiation ne pourrait-elle cibler que les cellules pré-tumorales <sup>486</sup>?

**Ainsi, il apparait que les hypothèses liées à une vision bénéfique du phénomène d'hypersensibilité aux faibles doses ne sont pas pertinentes. Au contraire, si des tissus sains montrent ce phénomène, il aboutira à une augmentation du risque radioinduit. On peut d'ailleurs être surpris que de nombreux chercheurs aient considéré ce phénomène comme spécifique des tumeurs, et, n'allant que dans un seul sens dans leur interprétation, n'aient pas considéré la diversité et l'hétérogénéité de leur réponse face aux radiations.**

### **6.1.5 Vers un modèle unifié ?**

**En conclusion, l'hormésis peut être considéré éventuellement comme un effet bénéfique si et seulement si :**

- **Dans le cadre des données expérimentales de biologie, les cellules des patients radiorésistants montrent un nombre suffisant de cassures spontanées de l'ADN pour que l'effet hormétique soit significatif**
- **Dans le cadre de données épidémiologiques, le risque ou l'excès de risque de cancer radioinduit est pris comme paramètre**

**Rappelons que tous les individus radiorésistants ne montrent pas forcément d'hormésis et que les conditions favorables à un effet hormétique sont rares en examen scanographique. Rappelons que même dans le cadre de ces contraintes, toutes les tumeurs groupe II ne sont pas HFD positives.**

**En parallèle, le phénomène de l'hypersensibilité aux faibles doses peut être considéré bénéfique si et seulement il concerne les tumeurs de radiosensibilité intermédiaire (type groupe II) et non les tissus sains. Par contre, le phénomène est délétère en diagnostic (scanners).**

Afin de clore cette partie consacrée aux effets radiobiologiques spécifiques des faibles doses, nous nous sommes efforcés d'analyser nos résultats dans leur ensemble afin de mieux vérifier leur cohérence. Il est difficile de trouver des conditions d'irradiation qui permettraient d'observer à la fois l'hypersensibilité aux faibles doses et l'hormésis. Toutefois, deux cas spécifiques se dégagent :

- Les survivants des bombardements de Nagasaki et d'Hiroshima chez qui l'hormésis a pu être observé mais où la contribution HFD n'a jamais encore été considérée
- Lors d'examens scanographiques où l'HFD et l'hormésis peuvent se rencontrer avec un débit d'environ 100 mGy/min. Toutefois, comme évoqué plus haut, ces 2 phénomènes ne peuvent concerner les mêmes individus.

Alors que le deuxième exemple fera l'objet de la deuxième partie de la discussion de cette thèse, il est important de noter que la description des risques liés au premier exemple reste indissociable du débat sur les modèles de risques linéaire sans seuil (LNT) et non-linéaire avec seuil (NLT). L'analyse des discussions qui ont occupé de nombreux radiobiologistes et décideurs ces 60 dernières années ne figurent pas dans



les objectifs de la thèse. Toutefois, on notera que les biais relevés dans les interprétations avancées dans le débat LNT/NLT restent les mêmes que celles avancées pour l'hormésis, la réponse adaptative, et le phénomène d'HFD :

- Nombreuses extrapolations des données animales à l'homme,
- Absence de considération du facteur individuel,
- Protocoles expérimentaux et méthodologies très diverses.

Par contre, si l'on part des données de risque de cancer issues de la cohorte des survivants du bombardement d'Hiroshima, on peut constater, comme le montre notre que l'hormésis et le phénomène HFD pourraient s'observer aux doses attendues et à des intensités qu'il serait intéressant d'investiguer car elles nous donneraient une estimation des sous-populations concernées par l'hormésis ou bien par l'HFD<sup>303</sup>. Ces simulations ont été effectuées dans notre article<sup>303</sup> et montrent qu'il suffirait de considérer quelques pourcentages d'individus radiorésistants (groupe I) montrant l'hormésis et une dizaine de pourcents d'individus radiosensibles de groupe II montrant l'HFD pour produire des données comparables à celles obtenues dans la littérature. On voit donc ici toute la puissance du modèle de transit d'ATM qui permet à la fois la prédiction de la radiosensibilité à fortes doses, apporte une interprétation biologique au modèle LQ et explique les conditions d'observation pour l'hormésis, la réponse adaptative et l'hypersensibilité aux faibles doses. A ce stade, deux remarques majeures peuvent être faites :

- **Effet du débit de dose** : Les données sur le bombardement d'Hiroshima ont été obtenues après une irradiation à un débit de dose très élevé, qui suggère, d'après nos publications, que le phénomène HFD sera plutôt visible à des doses de l'ordre de 100 à 200 mGy, ce qui correspond justement aux seuils de doses où le risque commence à devenir significatif. C'est dans cette zone que certaines données paraissent aussi plus élevées et qui permettraient de déterminer l'importance de cette sous-population HFD positive. Pour ce qui de l'hormésis, la gamme de dose à laquelle on observe ce phénomène ne devrait pas changer puisqu'il correspondrait à un stress sans production de CDB. Par contre, à des débits plus faibles, la gamme de dose où HFD devrait être observé devrait « glisser » vers des doses plus faibles puisque HFD dépend de la durée d'irradiation<sup>390</sup>. En même temps, du fait de l'étalement de la dose, le risque devrait diminuer et

donc la pente directrice des données devrait baisser. De même, les seuils à risque devraient logiquement être observés à des doses plus élevées. Ainsi, dans un mouvement de « glissement » général, la pente directrice des données s'approcherait de l'horizontale et HFD viendrait progressivement annuler l'effet hormétique. **Une modélisation mathématique serait ici bienvenue pour obtenir pour la première fois une estimation du risque radioinduit, non plus en fonction de la dose mais en fonction du débit.**

- En dehors de la discussion précédente au sujet du débit, il faut noter ici que l'introduction du facteur individuel dans l'évaluation du risque, c'est-à-dire de l'HFD et de l'hormésis, change la description que l'on peut faire de la relation dose-effet. En effet, de nouvelles contraintes apparaissent à des gammes de dose différentes. Ainsi, nous avons montré dans notre article sur l'hormésis qu'il est de plus en plus difficilement concevable, avec un « pic » HFD et un « pic inversé » d'hormésis, d'imaginer une loi mathématique qui soit simplement proportionnelle à la dose<sup>303</sup>. C'est pourquoi, là encore, **il faudra faire appel aux mathématiciens pour mieux déterminer si le modèle NLT n'est pas celui qui conviendrait le mieux et en déduire la gamme de doses concernées dans laquelle le risque serait soit négligeable soit non-détectable.**

**En conclusion de ce chapitre, on peut aujourd'hui considérer que le modèle du transit cytonucléaire d'ATM permet, pour la première fois à notre connaissance, de résoudre certaines énigmes de la radiobiologie sur les phénomènes spécifiques aux faibles doses. Ce modèle nous offre une vision nouvelle pour l'interprétation des expositions scanographiques.**

## **6.2 Apport des données radiobiologiques sur les scanners**

### **6.2.1 Un premier message : importance du facteur individuel**

L'une des toutes premières conclusions des deux articles concernant les scanners<sup>464,465</sup> est que, en dépit d'une dose physique identique, même faible, le nombre de cassures de l'ADN reconnues et / ou réparées peut ne pas être identique suivant les lignées cellulaires. En effet, toujours dans le cadre du modèle du transit d'ATM, les cellules de groupe II montreront un retard de transit d'ATM qui s'exprimera, même pour les doses scanographiques, par des conséquences au niveau de la réparation et de la signalisation des dommages de l'ADN. Ainsi, par exemple, le nombre de foci  $\gamma$ H2AX peut être plus faible pour les temps précoces post-irradiation (c'est la conséquence d'un manque de reconnaissance des CDB). Il peut être plus élevé pour les temps longs post-irradiation (c'est la conséquence d'un défaut de réparation). Toutefois, pour les lignées issues de syndromes prédisposant au cancer, le phénomène d'hyper-recombinaison peut complexifier les résultats en augmentant le nombre de CDB supplémentaires mais reconnues par la suture. Ce phénomène pourrait se rencontrer dans les minutes voire les heures qui suivent une irradiation.

Pour toutes ces raisons, nous nous sommes attachés à choisir judicieusement les lignées cellulaires testées, en considérant la plausibilité d'exposition : quels patients radiosensibles et/ou radiosusceptibles pourraient subir un scanner cérébral ou thoracique ? Ainsi, il était tout-à-fait plausible que, du fait de leur incidence élevée ou de leur risque élevé de cancer, des patients atteints du syndrome de Li-Fraumeni (mutations  $p53^{+/-}$ ), de la neurofibromatose de type 1 ( $NF1^{+/-}$ ), des porteurs de mutations hétérozygotes de BRCA1/BRCA2 ou de ATM, puissent subir une exposition scanographique. Dès lors, par ce choix de statuts génétiques d'étude, la caractérisation radiobiologique de fibroblastes exposés aux radiations ionisantes dans des conditions exactes d'examen scanographique pour mesurer le risque radioinduit avait un sens pratique, sociétal, médical et scientifique. C'est la première fois qu'un tel effort est réalisé dans la justification du choix du matériel biologique. A l'inverse, nous sommes conscients des limites de l'étude vis-à-vis du nombre de cas considérés. Avec les contraintes pratiques de rigueur méthodologique (nécessité d'avoir des expériences répétées, plusieurs témoins radiorésistants), nous ne pouvions dans ce cadre tester plus de lignées cellulaires car l'accès aux scanners est limité.

Une autre limite, déjà évoquée en 2011 avec les études sur les mammographies<sup>28</sup>, est la spécificité des biomarqueurs d'étude vis-à-vis de la radiosusceptibilité. En effet, jusqu'à présent,  $\gamma$ H2AX est considéré comme un biomarqueur de la non-réparation des CDB gérées par la réparation par suture, ou plus exactement un biomarqueur de la persistance de la phosphorylation des histones environnants les cassures de l'ADN. Alors que la radiosensibilité est liée à la non-réparation, la radiosusceptibilité est plutôt liée à la *mauvaise* réparation. Or, aucun biomarqueur de la mauvaise réparation n'a été validé à ce jour. Ainsi,  $\gamma$ H2AX apparaît ici comme un biomarqueur indirect de radiosusceptibilité, même si plus la radiosensibilité est grande, plus la radiosusceptibilité l'est également<sup>130</sup>. L'avantage d'ajouter le marqueur pATM est de compléter nos interprétations sur la signalisation où toute radiosusceptibilité significative est associée à un retard de transit d'ATM<sup>486</sup>. Ainsi, même si nos données non-publiées suggèrent que MRE11, contrôlé par ATM, pourrait être un marqueur de la mauvaise réparation, le fait de doubler les données  $\gamma$ H2AX par des données pATM renforce nos interprétations. Évidemment, seule une grande étude épidémiologique pourra convaincre les radiologues mais nous ne pouvons ignorer aujourd'hui, conformément aux modèles mécanistiques, qu'une faible dose de radiation ne peut être le synonyme d'un faible risque.

Les cinétiques d'apparition de foci  $\gamma$ H2AX couvrant la gamme de temps 10 min-24 h post-irradiation constituent une base de données essentielles qui permet de suivre dans le temps l'évolution de ces phénomènes souvent antagonistes. Nous avons abondamment montré dans les études antérieures que c'était surtout la cinétique de réparation qui était le meilleur critère de discrimination entre les lignées cellulaires et non l'analyse d'un seul temps post-irradiation<sup>130</sup>. Pourtant, les 2 articles<sup>464,465</sup> sont un exemple peu fréquent d'étude radiobiologique sur les scanners incluant des cinétiques post-irradiation<sup>406</sup>. D'ailleurs, les aspects innovants de nos deux études sont nombreux, c'est l'objet du chapitre suivant.

### **6.2.2 Deux études radiobiologiques très innovantes dans leur approche**

En plus du fait que le modèle de transit d'ATM est un modèle mécanistique très innovant, nos 2 études radiobiologiques sur l'exposition scanographique du cerveau et du thorax sont inédites et tranchent avec la littérature pour les raisons suivantes :

- Elles ne concernent pas des lymphocytes circulants mais d'autres tissus spécifiques d'intérêt comme la peau, le cerveau (plusieurs régions) et le sein (plusieurs régions). A ce titre, c'est la première fois que de tels modèles cellulaires pertinents pour chaque région scanographiée du corps (cerveau et thorax) sont utilisés
- Nous avons investigué l'impact de la radiosensibilité/radiosusceptibilité individuelle alors que la très grande majorité des études n'ont pas considéré ce facteur
- Nous avons abordé l'impact du nombre d'hélices dans les études et notamment les effets des répétitions de dose
- Tous les paramètres physiques et pratiques d'un scanner ont été étudiés comme le montre les tableau 11 et 12
- Les données  $\gamma$ H2AX ont été doublées à chaque fois par les données pATM, ce qui consolident nos conclusions, comme nous l'avons évoqué plus haut.
- La dosimétrie physique a été effectuée grâce au système dosimètre ponctuel de Fibermetrix<sup>449,450</sup>, ce qui rajoute une innovation de plus à cette étude.

Ce travail peut donc être considéré comme pionnier dans sa structure et son approche méthodologique. Il a également l'avantage de pouvoir extraire des données une interprétation cohérente avec le modèle de transit d'ATM. Il doit évidemment être accompagné d'études cliniques encore plus ambitieuses

### **6.3 Effet du produit de contraste**

Alors que depuis 2005, nous avons montré que les produits de contraste iodés, associés à une faible dose de rayons X délivrés à une énergie inférieure à 150 kV étaient un facteur aggravant<sup>487</sup>, nous n'avons pas considéré l'influence de ce facteur dans cette thèse pour les raisons suivantes :

- nous avons délibérément souhaiter nous focaliser sur les différents paramètres physiques du scanner et nous limiter à une dose physique donnée
- le nombre de paramètres différents à considérer, la lourdeur des expériences et l'accès limité aux irradiateurs étaient des facteurs limitants en pratique
- des données accumulées au cours de ces dernières années concernant les produits de contraste n'ont pas été encore publiées.

Pourtant, en plus des conclusions de cette thèse vis-à-vis des conséquences biologiques d'un examen scanographique, il faudra rajouter une étude spécifique complète sur l'application des produits de contraste.

Rappelons brièvement les acquis de 2005<sup>487</sup>. Entre 30 et 120 kV, le produit de contraste iodé peut subir lui-même une radiolyse dont l'ampleur dépend évidemment de la dose de radiation. Toutefois, les produits stables de la radiolyse se résument à des molécules complexes privées d'iode d'une part et des ions iodures libres d'autre part. Les ions iodures s'associent très rapidement dans le milieu biologique au sodium ou au potassium naturels pour former des petites molécules stables et très interactives avec le milieu biologique : NaI et KI. Or ces molécules traversent facilement les membranes nucléaires et peuvent s'associer à l'ADN voire parviennent à le précipiter. Des molécules de NaI ou de KI fixées sur l'ADN en présence de cassures ont la propriété d'inhiber la réparation par suture. Ainsi, des CDB radioinduites en présence de produits de contraste sont plus sévères et plus lentes à réparer. Si en plus, on se trouve dans une situation de cellules de groupe II où l'hyper-recombinaison se substitue à la suture en créant des CDB supplémentaires, l'effet iode est encore plus marqué<sup>487</sup>. Rappelons d'ailleurs que les bouteilles de produits de contraste, produit de synthèse, contiennent une quantité non négligeable de iodures libres sous forme d'impuretés, ce qui peut augmenter d'autant l'effet iode. Ainsi, il paraît logique qu'à la suite de cette thèse suive une étude plus générale intégrant l'effet iode dans l'évaluation du risque radioinduit.

#### **6.4 Quelles sont les conséquences radiobiologiques d'un examen scanographique d'après nos données ?**

D'après les données acquises dans le cadre de cette thèse, il apparaît que même une simple hélice dans des conditions standard produit des cassures de l'ADN et aboutit à moins d'une CDB non-réparée pour des tissus radorésistants, ce qui représente donc sans surprise une dose sublétale et non une dose létale. Toutefois, quand on considère la répétition de 2 hélices, la réponse dépend toujours du statut de radiosensibilité/radiosusceptibilité des cellules irradiées. Certaines lignées de groupe II montrent moins de cassures reconnues par la suture, suggérant que plus de cassures sont mal réparées, ce qui peut augmenter le risque de transformation cellulaire. Toutefois, ne négligeons pas non plus la 3<sup>ème</sup> conséquence d'une

irradiation : la radiodégénérescence. En effet, on peut effectivement imaginer que la répétition de faibles doses de radiation produit une accumulation de CDB tolérées par la cellule qui vieillit alors prématurément. Ainsi, considérons aujourd'hui que nous avons franchi deux grandes étapes :

- la mesurabilité des cassures de l'ADN induites par un examen scanographique dès la première hélice. A travers l'immunofluorescence  $\gamma$ H2AX et pATM, les dommages de l'ADN sont mesurables in vitro par irradiation directe et visibles dans plusieurs tissus différents (peau, cerveau, sein).
- la différence significative des résultats entre individus et entre tissus qui suggère qu'une étude systématique complète de grande ampleur qui tienne compte du facteur individuel est nécessaire. C'est un des apports majeurs et l'originalité de cette thèse.
- En dépit des limitations liés au faible nombre de lignées cellulaires testées, la présence de cellules avec plus de CDB que la normale et l'inadéquation entre dose physique et dose biologique sont d'autant plus lourdes de conséquences que l'examen irradiant considéré implique des faibles doses de rayons X et reste très fréquent dans les divers protocoles médicaux. On peut d'ailleurs s'interroger sur la justification de la répétition de tels examens dans des temps courts, sur des patients à risque.
- Enfin, en l'absence d'une étude épidémiologique de grande ampleur évoquée plus haut, l'absence de biomarqueurs spécifiques de la radiosusceptibilité ne peut plus être évoquée comme une raison suffisante pour ne pas tenir compte des doses délivrées : la littérature montre aujourd'hui clairement que toute différence d'effet biologique entre individus ou entre tissus impliquant plus de 2 CDB par cellule à des conséquences cliniques significatives, à court, moyen ou long terme.

## **6.5 Apports du dispositif IVIsScan**

### **6.5.1 Apports dosimétriques**

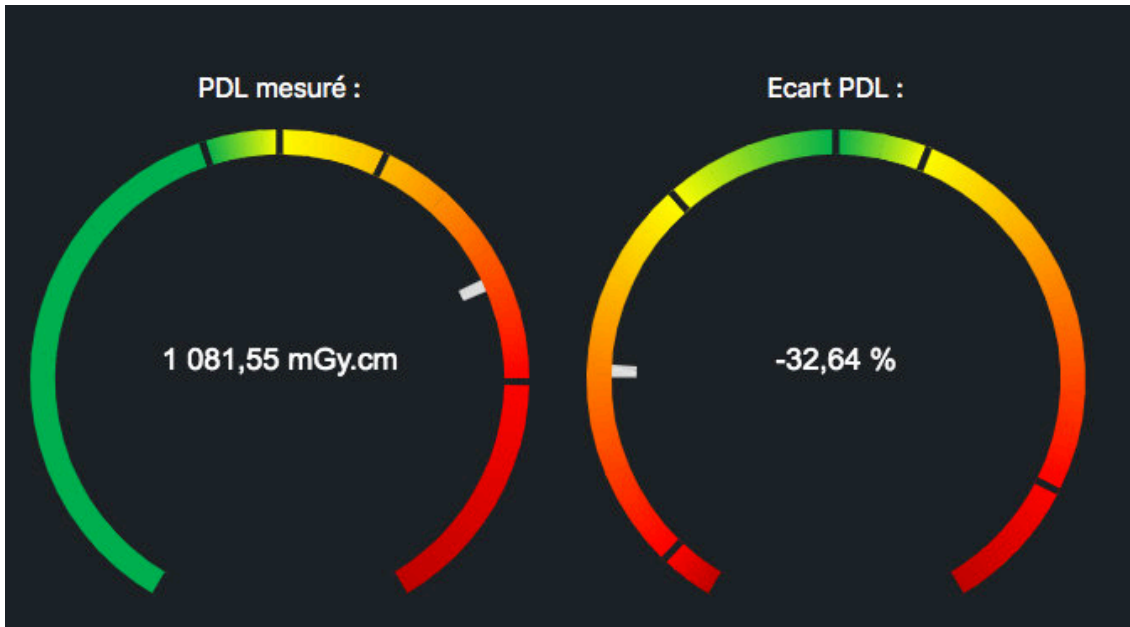
Le dispositif IVIsScan<sup>449,450</sup> développé par la société Fibermetrix permet notamment le recueil des données dosimétriques en temps réel pendant les examens scanographiques. Les valeurs de PDL et de CTDI fournies par le scanner (également affichées dans l'interface informatique « IVIyou » du dispositif et dédiée aux utilisateurs) sont des doses calculées à partir de simulations sur fantômes dosimétriques de référence<sup>(32)</sup>. La fibre optique scintillante installée sous le matelas de la table où est couché le patient, donne une dose mesurée avec une résolution temporelle élevée (ms). Cela permet d'avoir une mesure précise du CTDI tout le long de la zone exposée, contrairement aux données du constructeur qui affiche un PDL avec un CTDI considéré comme uniforme et constant. Ainsi, il est possible de réaliser une cartographie des variations du CTDI lors de l'examen, comme le montre la figure 61 du paragraphe 2.5. Cette donnée est très importante si on veut avoir une évaluation précise de la dose reçue et donc du risque associé pour certaines zones anatomiques spécifiques. Cela pourrait avoir un impact non négligeable sur l'estimation du risque par mGy déduite de certaines études épidémiologiques. Comme on l'a montré dans les tableaux 11 et 12 la dose absorbée peut être différente du CTDI selon la localisation de la mesure. Ce paramètre n'est donc pas forcément le plus adapté pour représenter la dose à l'organe comme c'est le cas actuellement. Le recueil rétrospectif des doses représente un des biais majeur dans les études épidémiologiques<sup>23,115</sup>. Dans l'optique d'améliorer la collecte de ces données, le dispositif IVIsScan pourrait représenter un outil de mesure plus précis, automatisé, universel et indépendant. En effet, les méthodes de calculs des doses affichées par les scanners peuvent varier en fonction des modèles et ne représentent pas des doses-patient. De plus, le fait que les doses-patient soient fournies par les constructeurs eux-mêmes, peut soulever des questions éthiques.

### **6.5.2 Contrôle local des pratiques**

Comme on l'a vu en introduction une grande variabilité peut être observée dans les pratiques pour les mêmes indications, d'un service de radiologie à l'autre, ou dans un même service<sup>32</sup>. L'interface informatique « IVIyou » du dispositif, dédiée aux utilisateurs, analyse et recoupe en temps réel les données des examens similaires à



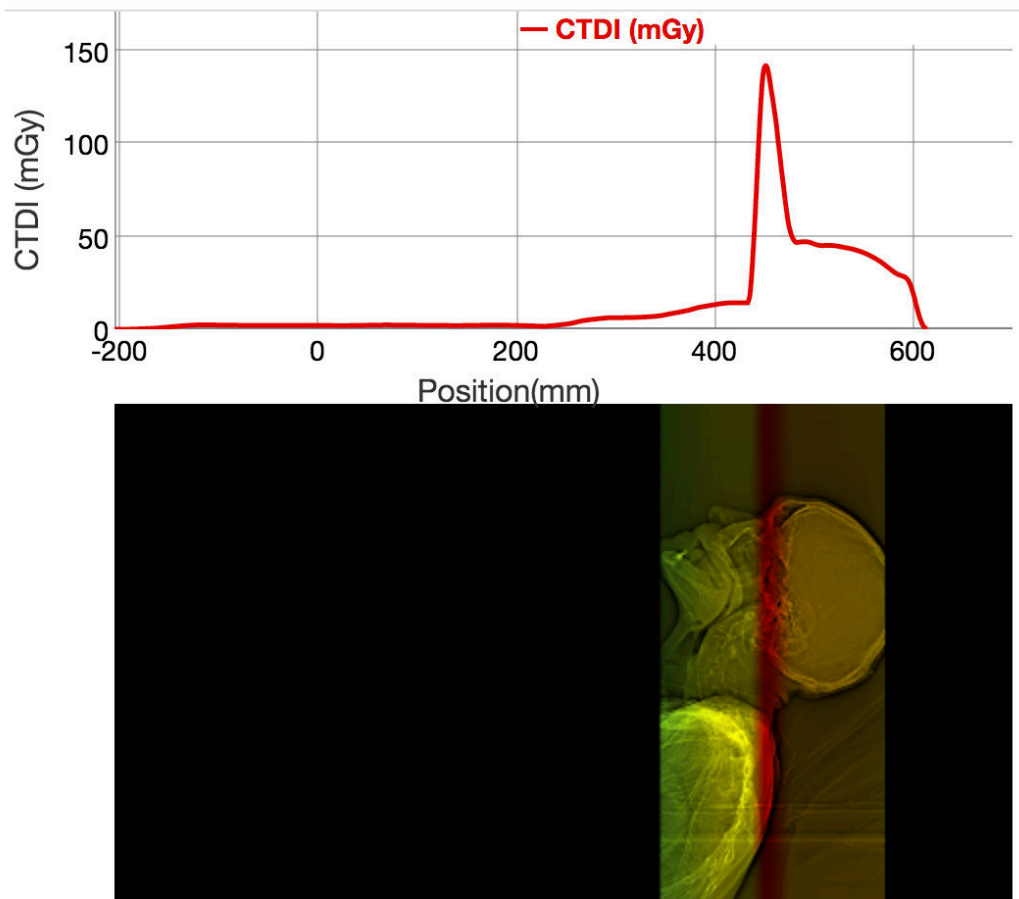
celui qui est en train d'être réalisé. Ainsi, à l'aide d'une jauge colorimétrique, le manipulateur peut immédiatement situer l'examen dans les standards dosimétriques de son service, offrant un contrôle des pratiques locales rapide et efficace.



**Figure 59** : Exemple de jauge colorimétrique affichée dans IVIyou immédiatement après l'examen. PDL de l'examen réalisé (à gauche) et l'écart avec ceux réalisés dans le service pour la même indication (à droite).

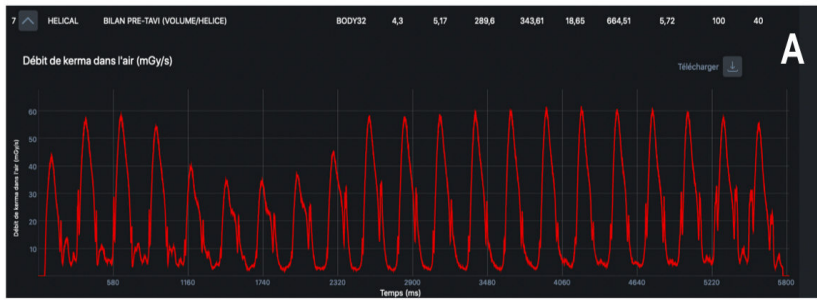
Si cet outil se destine plutôt à un usage concernant les examens « du quotidien », il peut également permettre de détecter certaines anomalies que nous allons illustrer par deux exemples concrets :

- Lors d'un scanner cérébral dans l'un des centres où est installé IVIscan, le patient a été placé de manière surélevée. Ceci a eu pour effet de positionner les yeux du patient au niveau de ses épaules. La modulation automatique des mAs s'est donc faite en fonction de la densité élevée due à ce positionnement. Le scanner a affiché un CTDI moyenné sur la longueur explorée et donc en le sous-estimant. En réalité, cela a eu pour effet de délivrer deux hélices de plus de 70 mGy pour une dose totale proche de 150 mGy au niveau du cristallin (figure 60).

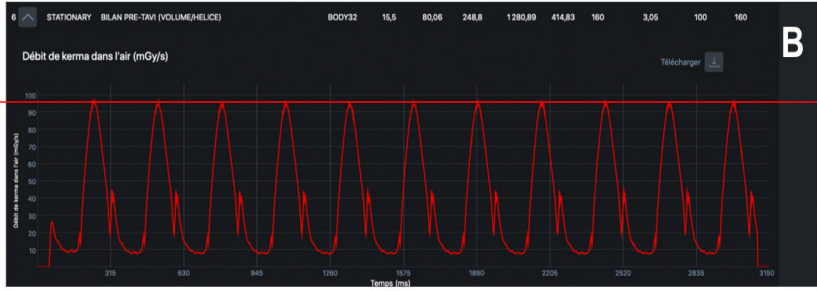


**Figure 60** : Exemple de situation détectée par le dispositif IVIsScan entraînant un CTDI anormalement élevé et sous-estimé à cause d'un mauvais positionnement du patient (ici 150mGy au niveau du cristallin).

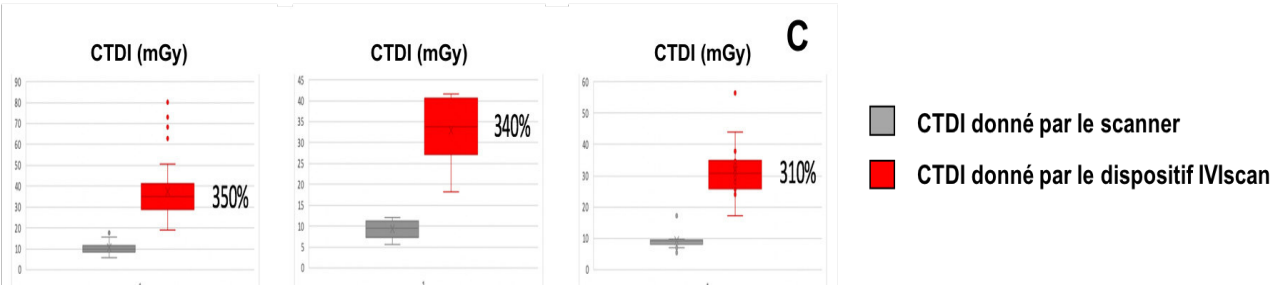
- Lors d'examens thoraciques ou cardiaques, le scanner va moduler le CTDI en fonction de la région corporelle explorée et donc baisser les mAs, et donc la dose, au niveau des zones qui sont d'une densité plus faible. Une utilisation normale de cette modulation est montrée sur le panneau **A** de la figure 61. Cependant, il arrive que cet outil ne fonctionne pas correctement et délivre un mA constant (Panneau **B**, figure 61) . Or, le scanner affiche un CTDI considérant la modulation opérationnelle. Il en résulte des valeurs de CTDI mesurées par IVIsScan bien au-dessus de celui affiché par la machine (jusqu'à +350%) (Panneau **C** figure 61).



mA variable



mA constant



**Figure 61 :** Exemple de modulation de mAs défailante et de CTDI sous-évalué. **A** Profil de débit de kerma dans l'air (en mGy/s) avec mA variable. **B** Profil de débit de kerma dans l'air (en mGy/s) avec mA constant. **C** Comparaison des CTDI donnés par le scanner et des CTDI donnés par le dispositif IVIsScan avec les excès de doses associés (en %)

A l'heure où la justification, l'optimisation et le renforcement des NRD deviennent des sujets majeurs aux vues de l'augmentation continue des doses délivrées en scanographie ces dernières années<sup>3,62</sup>, le dispositif IVIsScan propose un outil fiable et efficace pour un contrôle local des pratiques. Dans ce travail, ce système a permis de fournir des informations précieuses afin de réaliser les expériences de radiobiologie au plus près des conditions cliniques. Ce type de données peut parfois manquer dans les travaux de recherche et l'association de l'expertise des deux structures partenaires de cette thèse a été cruciale dans l'aboutissement de ce projet.

## **7 Conclusions et perspectives**

### **7.1 Conclusions personnelles sur ce travail de thèse**

Le dispositif de thèse Cifre permet la mise en place d'une collaboration de recherche entre un laboratoire public et une entreprise de droit français. Dans ce travail de thèse, l'Unité UA8 « Radiations : Défense, Santé, Environnement » et la société Fibermetrix ont mis en commun leurs expertises respectives concernant la dose physique et la dose biologique afin de permettre une meilleure évaluation du risque radioinduit chez les patients exposés aux rayonnements ionisants dans le cadre des examens scanographiques. Cette association m'a fait découvrir le monde de l'entreprise et ses enjeux qui diffèrent grandement de ceux rencontrés dans un laboratoire académique. Au-delà des travaux de recherche fondamentale réalisés pendant ces trois années durant lesquelles les échanges entre les deux structures ont été constants, j'ai mis en place un système IVIs can bêta-test sur les scanners du service de radiologie du Centre Léon Bérard. Cette installation a nécessité l'intervention du service technique, du service informatique, du service juridique, des cadres de santé, des manipulateurs radio et des radiophysiciens du Centre Léon Bérard ainsi que l'aide du technicien et de l'ingénieur d'application Siemens. En plus de développer mes capacités de gestion de projet, les interactions avec tous ces différents corps de métier ont été très enrichissantes. J'ai organisé régulièrement des réunions avec les équipes du service de radiologie du centre afin d'expliquer les tenants et les aboutissants de mon travail, dans le but d'impliquer au maximum les différents acteurs nécessaires à la réalisation de ce projet. Au fur et à mesure de mon intégration dans le service, j'ai pu être formé à utiliser moi-même les scanners hors des temps dédiés aux patients et j'ai pu mettre en place une véritable plateforme de recherche de radiobiologie en radiodiagnostic avec des supports d'irradiation cellulaire adaptés à ce type de modalité.

## 7.2 Perspectives

Comme on l'a vu en discussion, il existe certaines limitations à notre étude radiobiologique en scanographie. La première est le manque de marqueur de radiosusceptibilité. En plus de la possibilité de faire une autre étude avec le marqueur MRE11 en parallèle de  $\gamma$ H2AX et pATM, d'autres marqueurs de radiosusceptibilité sont actuellement à l'étude dans le laboratoire et une application en radiodiagnostic est envisagée. Une autre limitation de notre étude est le nombre de lignées cellulaires radiorésistantes. Le projet INDIRA actuellement en cours dans le laboratoire a pour but d'étudier la proportion de la radiosensibilité individuelle dans la population générale. Ce projet nous permettra d'obtenir un plus grand nombre de témoins à des passages faibles et ainsi compléter nos données. L'étude de l'influence du produit de contraste est également un enjeu majeur des expositions scanographiques. Produire des données incluant les PCI en combinaison des données de ce travail de thèse et de celles non publiées du laboratoire sur le sujet serait un travail intéressant à mener. De manière générale, l'utilisation des scanners en autonomie acquise pendant cette thèse a permis d'augmenter l'accessibilité aux machines et permettra donc de mener d'autres études sur le sujet à l'avenir.

Le dispositif IVIScan de la société Fibermetrix permet la collecte d'un grand nombre de données dosimétriques. Comme on l'a vu dans le paragraphe 5.2.1.5, le recueil et l'analyse de ces données est rendu difficile par un certain nombre de paramètres. Une analyse plus approfondie de ces données et un article dédié est actuellement en cours. De plus, la société Fibermetrix développe actuellement un équivalent du dispositif IVIScan pour la radiologie interventionnelle ainsi que pour la radiothérapie avec imagerie portale. Il serait très intéressant d'étudier les phénomènes spécifiques aux faibles doses abordés dans cette thèse et plus particulièrement l'effet des répétitions de doses pour la radiologie interventionnelle et la réponse adaptative dans le cas de la radiothérapie avec imagerie portale. Ce travail est envisagé à travers une nouvelle thèse Cifre qui a démarré en 2020 entre les deux structures.

## 8 Bibliographie

1. UNSCEAR. *BIOLOGICAL MECHANISMS OF RADIATION ACTIONS AT LOW DOSES A white paper to guide the Scientific Committee's future programme of work.* (2012).
2. Bethesda, M. Ionizing Radiation Exposure of the Population of the United States. 2009. NCRP report 160. *Natl. Counc. Radiat. Prot. Meas.* (2009).
3. Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire. *Exposition de la population française aux rayonnements ionisants Rapport IRSN/2015-00001.* (2015).
4. G.N, H. Computerized transverse axial scanning(tomography):Part I description of system. *Br. J. Radiol.* **46**, 1016–1022 (1973).
5. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. *SOURCES AND EFFECTS OF IONIZING RADIATION.* (2008).
6. Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire. Exposition de la population française aux rayonnements ionisants liée aux actes de diagnostic médical en 2012. **PRP-HOM**, (2012).
7. De González, A. B. & Darby, S. Risk of cancer from diagnostic X-rays. *Lancet* **363**, 1908–1909; author reply 1910 (2004).
8. Wylie, J. D. *et al.* Computed Tomography Scans in Patients With Young Adult Hip Pain Carry a Lifetime Risk of Malignancy. *Arthrosc. - J. Arthrosc. Relat. Surg.* **34**, 155-163.e3 (2018).
9. Meulepas, J. M. *et al.* Radiation exposure from pediatric CT scans and subsequent cancer risk in the Netherlands. *J. Natl. Cancer Inst.* **111**, 256–263 (2019).
10. Nordenskjöld, A. C., Bujila, R., Aspelin, P., Flodmark, O. & Kaijser, M. Risk of Meningioma after CT of the Head. *Radiology* **285**, 568–575 (2017).
11. Krille, L. *et al.* Risk of cancer incidence before the age of 15 years after exposure to ionising radiation from computed tomography: results from a German cohort study. *Radiat. Environ. Biophys.* **54**, 1–12 (2015).
12. Amy Berrington de González, Mahadevappa Mahesh, Kwang-Pyo Kim, Mythreyi Bhargavan, Rebecca Lewis, Fred Mettler, and C. L. Projected Cancer Risks From Computed Tomographic Scans Performed in the United States in 2007. *Arch. Intern. Med.* **169**, 2071–2077 (2009).
13. Huang, W.-Y. *et al.* Paediatric head CT scan and subsequent risk of malignancy and benign brain tumour: a nation-wide population-based cohort study. *Br. J. Cancer* **110**, 2354–2360 (2014).
14. Journy, N. M. Y. *et al.* Projected cancer risks potentially related to past, current, and future practices in paediatric CT in the United Kingdom, 1990-2020. *Br. J. Cancer* **116**, 109–116 (2017).
15. Pearce, M. S. *et al.* Radiation exposure from CT scans in childhood and subsequent risk of leukaemia and brain tumours: A retrospective cohort study. *Lancet* **380**, 499–505 (2012).
16. Cardis, E. *et al.* Risk of cancer after low doses of ionising radiation - Retrospective cohort study in 15 countries. *Br. Med. J.* **331**, 77–80 (2005).
17. Mathews, J. D. *et al.* Cancer risk in 680,000 people exposed to computed tomography scans in childhood or adolescence: data linkage study of 11 million Australians. *Bmj* **346**, f2360 (2013).
18. Yecies, T. *et al.* Evaluation of the Risks and Benefits of CT Urography for Assessment of Gross Hematuria. *Urology* (2019). doi:10.1016/j.urology.2019.04.055
19. Brenner, D. J. & Hall, E. J. Computed tomography : an increasing source of radiation exposure. *N. Engl. J. Med.* **357**, 2277–2284 (2007).

20. Andrew J. Einstein, Milena J. Henzlova, S. R. Estimating Risk of Cancer Associated With Radiation Exposure From 64-Slice Computed Tomography Coronary Angiography. *JAMA* **298**, 317–323 (2007).
21. Nikkilä, A., Raitanen, J., Lohi, O. & Auvinen, A. Radiation exposure from computerized tomography and risk of childhood leukemia: Finnish register-based case-control study of childhood leukemia (FRECCLE). *Haematologica* **103**, 1873–1880 (2018).
22. UNSCEAR. *UNSCEAR 2013 Report: 'Sources, effects and risks of ionizing radiation' Annex B - Effects of radiation exposure of children.* (2013).
23. Baysson, H. *et al.* Exposition à la scanographie dans l'enfance et risque de cancer à long terme. Une synthèse des études épidémiologiques récentes. *Bull. Cancer* **103**, 190–198 (2016).
24. Cohen, M. Cancer risks from CT radiation: Is there a dose threshold? *J. Am. Coll. Radiol.* **10**, 817–819 (2013).
25. Journy, N. *et al.* Are the studies on cancer risk from CT scans biased by indication? Elements of answer from a large-scale cohort study in France. *Br. J. Cancer* **112**, 185–193 (2015).
26. Hendee, W. R. & O'Connor, M. K. Radiation Risks of Medical Imaging: Separating Fact from Fantasy. *Radiology* **264**, 312–321 (2012).
27. Foray, N., Colin, C. & Bourguignon, M. 100 Years of Individual Radiosensitivity: How We Have Forgotten the Evidence. *Radiology* **264**, 627–631 (2012).
28. Colin, C. *et al.* DNA double-strand breaks induced by mammographic screening procedures in human mammary epithelial cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **87**, (2011).
29. Foray, N., Colin, C. & Bourguignon, M. Radiosensibilité : L'évidence d'un facteur individuel. *Médecine Sci.* 29:397-403 (2013).
30. Committee to Assess Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation. National Research Council. Health Risks from Exposure to low levels of Ionizing Radiation: BEIR VII – Phase 2. *Natl. Acad. Press. Washington, D.C.* (2006).
31. Averbek, D. *et al.* Progress in low dose health risk research: Novel effects and new concepts in low dose radiobiology. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* **776**, 46–69 (2018).
32. IRSN. *Doses délivrées aux patients En scanographie. Analyse des recueils de doses de 9 services de radiologie en France 2012.* (2013).
33. Roentgen, W. Über eine neue art von strahlen. Vorläufige mitteilung. Aus den Sitzungsberichten der Würzburger. *Phys. Gesellschaft Würzbg.* S137–47 (1895).
34. Goodman, L. R. The Beatles, the Nobel Prize, and CT Scanning of the Chest. *Radiol. Clin. North Am.* **48**, 1–7 (2010).
35. Alexander, R. E. & Gunderman, R. B. EMI and the first CT scanner. *J. Am. Coll. Radiol.* **7**, 778–781 (2010).
36. Ambrose, J. CT scanning: A backward look. *Semin. Roentgenol.* **12**, 7–11 (1977).
37. New, P., Scott, W., Schnur, J., Davis, K. & Taveras, J. Computerized axial tomography (EMI scanner). *Neuroradiology* **126**, 327–328 (1974).
38. Schellinger, D., Di Chiro, G., Axelbaum, S. P., Twigg, H. L. & Ledley, R. S. Early clinical experience with the ACTA scanner. *Radiology* **114**, 257–261 (1975).
39. Ginat, D. T. & Gupta, R. Advances in Computed Tomography Imaging Technology. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **16**, 431–453 (2014).
40. Rubin, G. D. Computed tomography: Revolutionizing the practice of medicine for 40 years. *Radiology* **273**, S45–S74 (2014).
41. Forghani, R., De Man, B. & Gupta, R. Dual-Energy Computed Tomography: Physical Principles, Approaches to Scanning, Usage, and Implementation: Part 1. *Neuroimaging Clin. N. Am.* **27**, 385–400 (2017).

42. Thornton, F. J., Paulson, E. K., Yoshizumi, T. T., Frush, D. P. & Nelson, R. C. Single versus Multi-Detector Row CT. *Acad. Radiol.* **10**, 379–385 (2003).
43. Kalra, M. K. *et al.* Strategies for CT Radiation Dose Optimization. *Radiology* **230**, 619–628 (2004).
44. Schardt, P. *et al.* New x-ray tube performance in computed tomography by introducing the rotating envelope tube technology. *Med. Phys.* **31**, 2699–2706 (2004).
45. Kalra, M. K. *et al.* Techniques and applications of automatic tube current modulation for CT. *Radiology* **233**, 649–657 (2004).
46. Bricault, I. La reconstruction itérative en scanner : pourquoi ? Comment ça marche ? *J. d'imagerie diagnostique Interv.* **1**, 76–80 (2018).
47. IRSN. *Parc de scanners et recommandations relatives à la radioprotection en imagerie médicale.* (2018).
48. Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire. *Recommandations du groupe de travail sur les niveaux de référence diagnostiques (NRD) en imagerie médicale.* (2015).
49. ASN. *Etat de la radioprotection en scannographie. Rapport de l'Autorité de Sureté Nucléaire ASN* (2015). doi:10.1515/mamm.1991.55.4.665
50. Descamps, C., Gonzalez, M., Garrigo, E., Germanier, A. & Venencia, D. Measurements of the dose delivered during CT exams using AAPM Task Group Report No. 111. *J. Appl. Clin. Med. Phys* (2012).
51. Mccollough, C. *et al.* CT Dose Index and Patient Dose : They are not the same thing. *Radiology* **259**, 311–316 (2011).
52. Van Der Molen, A. & Geleijns, J. Overranging in Multisection CT: Quantification and Relative Contribution to Dose-Comparison of Four 16-Section CT Scanners. *Radiology* **242**, (2007).
53. Li, X. & Liu, B. Estimation of the weighted CTDI<sub>∞</sub> for multislice CT examinations. *Med Phys* **901**, (2018).
54. Demarco, J. A Monte Carlo based method to estimate radiation dose from multidetector CT (MDCT): cylindrical and anthropomorphic phantoms. *Phys. Med. Biol* **50**, 3989–4004 (2005).
55. AAPM. Size-Specific Dose Estimates in Pediatric and Adult Body CT Examinations. *Rep. n°24*
56. Li, J. *et al.* Automatic patient centering for MDCT: Effect on radiation dose. *Am. J. Roentgenol* **188**, 547– 552 (2007).
57. Habibzadeh, M., Ay, M., Asl, A., Ghadiri, H. & Zaidi, H. Impact of miscentering on patient dose and image noise in x-ray CT imaging: Phantom and clinical studies. *Phys. Medica* **28**, 191–199 (2012).
58. Kaasalainen, T., Palmu, K., Lampinen, A. & Kortensniemi, M. Effect of vertical positioning on organ dose, image noise and contrast in pediatric chest CT - Phantom study. *Pediatr. Radiol* **43**, 673–684 (2013).
59. Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire. Doses délivrées aux patients en scanographie et en radiologie conventionnelle. *irsn Rep.* (2010).
60. ICRP. The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP publication 103. *Ann. ICRP, Sage journals* (2007).
61. on Medical Aspects of Radiation in the Environment, C. *Committee on Medical Aspects of Radiation in the Environment (COMARE) SIXTEENTH REPORT Patient radiation dose issues resulting from the use of CT in the UK Chairman: Professor A Elliott.* (2014).
62. National Council on Radiation Protection and Measurements. Ionizing Radiation Exposure of the Population of the United States. *NCRP Rep. 160* (2009).



63. Hart, D., Wall, B., Hillier, M. & Shrimpton, P. *Frequency and collective dose for medical and dental X-ray examinations in the UK, 2008. Health Protection Agency HPA-CRCE-012* (2010).
64. IRSN. Exposition des enfants aux rayonnements ionisants liée aux actes diagnostiques en 2010 en France Rapport PRP-HOM N°2013-3. *IRSN Rep.* 3–45 (2013).
65. Academie des sciences. Rapport et recommandations concernant l’usage des rayons X au cours de l’imagerie diagnostique et interventionnelle, à l’exclusion de la radiothérapie. (2016).
66. Pearce, M. S. *et al.* CT Scans in Young People in Great Britain: Temporal and Descriptive Patterns, 1993–2002. *Radiol. Res. Pract.* 1–8 (2012). doi:10.1155/2012/594278
67. European Society of Radiology (ESR). White paper on radiation protection by the European Society of Radiology. *Insights Imaging* **2**, 357–362 (2011).
68. Bouëtté, A. *et al.* National audit on the appropriateness of CT and MRI examinations in Luxembourg. *Insights Imaging* **10**, (2019).
69. Brenner, D. J., Hall, E. J. & Phil, D. Computed tomography - An increasing source of radiation exposure. *N. Engl. J. Med.* **48**, 657 (2007).
70. ASN. *la revue technique de la sûreté nucléaire et de la radioprotection - contrôle n°197 Mars 2014.* (2014).
71. Kruger, J. F. *et al.* Clinician perspectives on considering radiation exposure to patients when ordering imaging tests: A qualitative study. *BMJ Qual. Saf.* **23**, 893–901 (2014).
72. Stickrath, C., Druck, F., Hensley, N., Maddox, T. & Richlie, D. Patient and Health Care Provider Discussions About the Risks of Medical imaging: Not Ready for Prime Time. *Arch intern med* **172**, 1037–1038 (2012).
73. Freudenberg, L. S. & Beyer, T. Subjective perception of radiation risk. *J. Nucl. Med.* **52**, 29–36 (2011).
74. Soye, J. A. & Paterson, A. A survey of awareness of radiation dose among health professionals in Northern Ireland. *Br. J. Radiol.* **81**, 725–729 (2008).
75. Lumberras, B. *et al.* Evaluation of clinicians’ knowledge and practices regarding medical radiological exposure: findings from a mixed-methods investigation (survey and qualitative study). *BMJ Open* **6**, e012361 (2016).
76. Dauer, L. T. *et al.* Fears, feelings, and facts: Interactively communicating benefits and risks of medical radiation with patients. *Am. J. Roentgenol.* **196**, 756–761 (2011).
77. Lee, C. I., Haims, A. H., Monico, E. P., Brink, J. A. & Forman, H. P. Diagnostic CT Scans: Assessment of Patient, Physician, and Radiologist Awareness of Radiation Dose and Possible Risks. *Radiology* **231**, 393–398 (2004).
78. Journy, N. M. Y. *et al.* Individual radiation exposure from computed tomography: a survey of paediatric practice in French university hospitals, 2010–2013. *Eur. Radiol.* **28**, 630–641 (2018).
79. Vassileva, J. *et al.* IAEA survey of paediatric computed tomography practice in 40 countries in Asia, Europe, Latin America and Africa: Procedures and protocols. *Eur. Radiol.* **23**, 623–631 (2013).
80. Célier, D., Roch, P., Etard, C., Ducou Le Pointe, H. & Brisse, H. Multicentre survey on patient dose in paediatric imaging and proposal for updated diagnostic reference levels for France . Part 1 : computed tomography. *Eur. Radiol.* (2019).
81. Smith-Bindman, R. *et al.* International variation in radiation dose for computed tomography examinations: Prospective cohort study. *BMJ* **364**, 1–12 (2019).
82. Kalra, M. K. *et al.* Radiation from ‘extra’ images acquired with abdominal and/or pelvic CT: Effect of automatic tube current modulation. *Radiology* **232**, 409–414 (2004).

83. Liao, E. *et al.* Extra Z-axis Coverage at CT Imaging Resulting in Excess Radiation Dose: Frequency, Degree and Contributory Factors. *Bone* **23**, 1–7 (2011).
84. Campbell, J., Kalra, M. K., Rizzo, S., Maher, M. M. & Shepard, J. A. Scanning beyond anatomic limits of the thorax in chest CT: Findings, radiation dose, and automatic tube current modulation. *Am. J. Roentgenol.* **185**, 1525–1530 (2005).
85. Schwartz, F., Stieltjes, B., Szucs-Farkas, Z. & Euler, A. Over-scanning in chest CT: Comparison of practice among six hospitals and its impact on radiation dose. *Eur. J. Radiol.* **102**, 49–54 (2018).
86. Zanca, F., Demeter, M., Oyen, R. & Bosmans, H. Excess radiation and organ dose in chest and abdominal CT due to CT acquisition beyond expected anatomical boundaries. *Eur. Radiol.* **22**, 779–788 (2012).
87. Raman, S. P. *et al.* CT dose reduction applications: Available tools on the latest generation of CT scanners. *J. Am. Coll. Radiol.* **10**, 37–41 (2013).
88. 73, I. P. ICRP, 1996. Radiological Protection and Safety in Medicine. *Ann. ICRP* **26**, (1996).
89. IRSN. IRSN - Mise à jour des Niveaux de Référence Diagnostiques en radiologie et en médecine nucléaire : Bilan 2013-2015. 129 (2016).
90. Meeson, S., Alvey, C. M. & Golding, S. J. Justifying multidetector CT in abdominal sepsis: time for review? *Br. J. Radiol.* **82**, 190–197 (2009).
91. Sodickson, A. *et al.* Recurrent CT, cumulative radiation exposure, and associated radiation-induced cancer risks from CT of adults. *Radiology* **251**, 175–184 (2009).
92. Owlia, M. *et al.* Head CT scan overuse in frequently admitted medical patients. *Am. J. Med.* **127**, 406–410 (2014).
93. Habib Geryes, B. *et al.* Patient dose evaluation in computed tomography: A French national study based on clinical indications. *Phys. Medica* **61**, 18–27 (2019).
94. UNSCEAR. Report of the United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation 2012. Scientific Annex A: Attributing Health Effects to Ionizing Radiation Exposure and Inferring Risks, United Nations, 2012. (2012).
95. UNSCEAR. Report of the United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation 2012. Scientific Annex B: Uncertainties in Risk Estimates for Radiation-induced Cancer, United Nations, 2012. (2012).
96. Calabrese, E. J. Origin of the linearity no threshold (LNT) dose-response concept. *Arch. Toxicol.* **87**, 1621–1633 (2013).
97. Calabrese, E. J. From Muller to mechanism: How LNT became the default model for cancer risk assessment. *Environ. Pollut.* **241**, 289–302 (2018).
98. Bethesda, M. NCRP 2018 Implications of Recent Epidemiologic Studies for the Linear Nonthreshold Model and Radiation Protection, Commentary No. 27. *Natl. Counc. Radiat. Prot. Meas.* (2018).
99. Shore, R. *et al.* Implications of recent epidemiologic studies for the linear nonthreshold model and radiation protection. *Int. J. Pharm.* **127**, 549–59 (2018).
100. Brenner, D. J. *et al.* Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: assessing what we really know. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 13761–6 (2003).
101. Doll, R. & Wakeford, R. Risk of childhood cancer from fetal irradiation. *Br. J. Radiol.* **70**, 130–139 (1997).
102. Calabrese, E. J. & Baldwin, L. A. Radiation hormesis: Its historical foundations as a biological hypothesis. *Hum. Exp. Toxicol.* **19**, 41–75 (2000).
103. Calabrese, E. Hormesis: a fundamental concept in biology. *Microb Cell* 1(5):145-149 (2014).
104. Marples, B, Collis, S. Low-dose hyper-radiosensitivity: Past, present, and future. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **70**:1310-1318 (2008).

105. Fukunaga, H. & Yokoya, A. Low-dose radiation risk and individual variation in radiation sensitivity in Fukushima. *J. Radiat. Res.* **57**, 98–100 (2016).
106. Yuan, M. K. *et al.* The risk of cataract associated with repeated head and neck CT studies: A nationwide population-based study. *Am. J. Roentgenol.* **201**, 626–630 (2013).
107. Brenner, D. J., Elliston, C. D., Hall, E. J. & Berdon, W. E. Estimated Risks of Radiation- Induced Fatal Cancer from Pediatric CT. *Am. Roentgen Ray Soc.* **176**, 289–296 (2001).
108. Journy, N. *et al.* Predicted cancer risks induced by computed tomography examinations during childhood, by a quantitative risk assessment approach. *Radiat. Environ. Biophys.* **53**, 39–54 (2014).
109. Miglioretti, D. *et al.* Pediatric Computed Tomography and Associated Radiation Exposure and Estimated Cancer Risk. *JAMA Pediatr.* **18**, 1089–1098 (2013).
110. Bosch de Basea, M. *et al.* CT scan exposure in Spanish children and young adults by socioeconomic status: Cross-sectional analysis of cohort data. *PLoS One* **13**, e0196449 (2018).
111. Journy, N. *et al.* Are the studies on cancer risk from CT scans biased by indication? Elements of answer from a large-scale cohort study in France. *Br. J. Cancer* **112**, 185–193 (2015).
112. Boice, J. D. Radiation epidemiology and recent paediatric computed tomography studies. *Ann. ICRP* **44**, 236–248 (2015).
113. Zondervan, R. L., Hahn, P. F., Sadow, C. A., Liu, B. & Lee, S. I. Frequent body CT scanning of young adults: Indications, outcomes, and risk for radiation-induced cancer. *J. Am. Coll. Radiol.* **8**, 501–507 (2011).
114. Walsh, L., Shore, R., Auvinen, A., Jung, T. & Wakeford, R. Risks from CT scans - What do recent studies tell us? *J. Radiol. Prot.* **34**, 0–5 (2014).
115. Till, J., Beck, H., Grogan, H. & Caffrey, A. A review of dosimetry used in epidemiological studies considered to evaluate the linear no- threshold (LNT) dose-response model for radiation protection. *Int. J. Radiat. Biol.* 1362–3095 (2017).
116. Meulepas, J. M., Hauptmann, M., Lubin, J. H., Shuryak, I. & Brenner, D. J. Is there Unmeasured Indication Bias in Radiation-Related Cancer Risk Estimates from Studies of Computed Tomography? *Radiat. Res.* **189**, 128 (2017).
117. Journy, N. *et al.* Childhood CT scans and cancer risk: impact of predisposing factors for cancer on the risk estimates. *J. Radiol. Prot.* **36**, N1–N7 (2016).
118. Bosch De Basea, M. *et al.* EPI-CT: Design, challenges and epidemiological methods of an international study on cancer risk after paediatric and young adult CT. *J. Radiol. Prot.* **35**, 611–628 (2015).
119. Bernier, M. O. *et al.* Cohort profile: The EPI-CT study: A European pooled epidemiological study to quantify the risk of radiation-induced cancer from paediatric CT. *Int. J. Epidemiol.* **48**, 379–381g (2019).
120. Shuryak, I., Lubin, J. H. & Brenner, D. J. Potential for Adult-Based Epidemiological Studies to Characterize Overall Cancer Risks Associated with a Lifetime of CT Scans. *Radiat. Res.* **181**, 584–591 (2014).
121. Britel, M., Bourguignon, M. & Foray, N. The use of the term ‘radiosensitivity’ through history of radiation: from clarity to confusion. *Int. J. Radiat. Biol.* **94**, 503–512 (2018).
122. Granzotto, A. *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.* **94**, 450–460 (2016).
123. Haute Autorité de Santé. Radioprotection du patient et analyse des pratiques DPC et certification des établissements de santé. (2012).

124. 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 (Paris). 143 : 983 – 984 (1906).
125. Vogin, G. & Foray, N. The law of Bergonié and Tribondeau: A nice formula for a first approximation. *Int. J. Radiat. Biol.* **89**, 2–8 (2013).
126. Begg, A. The clinical status of Tpot as a predictor? Or why no tempest in the Tpot! *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 32:1539–1541 (1995).
127. Antognoni, P. *et al.* The predictive role of flow cytometry-derived tumor potential doubling time (Tpot) in radiotherapy: Open questions and future perspectives. *Int. J. Oncol.* **12:245–256**, (1998).
128. Foray, N. *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.* **72**, 271–283 (1997).
129. 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.* 73:373–382 (2004).
130. Bodgi, L. & FORAY, N. *Effets biologiques des radiations ionisantes. Une théorie basée sur le transit cyto-nucléaire de la protéine ATM. Applications à la radiothérapie.* (2015).
131. Tubiana M, Dutreix J, W. A. *Radiobiologie.* (1986).
132. JF, W. Biochemistry of DNA lesions. *Radiat. Res. Suppl.* S103-11 (1985).
133. Evans, R. the atomic nucleus. *USA Malabar, FL Krieger Publ.* (1985).
134. Paretzke, H. adiation track structure theory. in *In: Freeman GR, editor Kinetics of nonhomogenous processes. New York, USA: Wileys and Sons* 89-170. (1987).
135. Nikjoo, H., Goodhead, D., Charlton, D. & HG, P. Energy deposition in small cylindrical targets by ultrasoft x-rays. *Phys. Med. Biol.* 34:691-705 (1989).
136. Goodhead, D. The initial physical damage produced by ionizing radiations. *Int. J. Radiat. Biol.* 56:623-634. (1989).
137. Goodhead, D. & Nikjoo, H. Track structure analysis of ultrasoft x-rays compared to high- and low-let radiations. *Int. J. Radiat. Biol.* 55:513-529. (1989).
138. Siddiqi, M. & Bothe, E. Single- and double-strand break formation in DNA irradiated in aqueous solution: Dependence on dose and oh radical scavenger concentration. *Radiat. Res.* 112:449-463 (1987).
139. Fielden, E. & O'Neill, P. The early effects of radiation on DNA. *Berlin : Springer* (1991).
140. Hall, E. & Giacca, A. Radiobiology for the radiologist. *Philadelphia, USA Lippincott Wilkins Williams* (2006).
141. Tubiana, M. *Radiobiologie. Radiothérapie et radioprotection. Bases fondamentales Paris: Hermann/Médecine.* (2008).
142. Daniels, M. & Wigg, E. Oxygen as a primary species in radiolysis of water. *Science (80- .)* 153:1533-1534 (1966).
143. Jonah, C. short history of the radiation chemistry of water. *Radiat. Res.* 144:141-147. (1995).
144. Morrison, C. *et al.* Genetic interaction between parp and DNA-pk in v(dj) recombination and tumorigenesis. *Nat. Genet.* 17:479-482 (1997).
145. Breen, A. & Murphy, J. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic. Biology Med.* 18:1033-1077 (1995).
146. Cadet, J. *et al.* Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat. Res.* 424:9–21 (1999).
147. Moustacchi, E. DNA damage and repair: Consequences on dose-responses. *Mutat. Res.* 464:35–40 (2000).

148. Lindahl, T. & Wood, R. Quality control by DNA repair. *Science* (80-. ). 286:1897-1905 (1999).
149. Ward, J. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: Identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog. nucleic acid Res. Mol. Biol.* 35:95-125 (1988).
150. Frankenberg-Schwager, M. Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells in vitro by ionizing radiation. *Radiother. Oncol.* 14:307-320. (1989).
151. Foray, N. *et al.* Repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in human fibroblasts is consistent with a continuous spectrum of repair probability. *Int. J. Radiat. Biol.* 74:551-560 (1998).
152. Schneeweiss, F., Tisljar-Lentulis, G., Hausteiner, K. & Feinendegen, L. 'Periodical' pattern of kinetics of DNA strand break repair following gamma-irradiation of human t1-cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 52:491-493 (1987).
153. Steel, G. *Basic clinical radiobiology, 3rd ed. London: Arnold Publishers.* (1993).
154. Iliakis, G. The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. *Bioessays* 13:641-648 (1991).
155. Badie, C. *et al.* Induction and rejoining of DNA double-strand breaks and interphase chromosome breaks after exposure to x rays in one normal and two hypersensitive human fibroblast cell lines. *Radiat. Res.* 144:26–35 (1995).
156. Foray, N. *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.* 72:271-283. (1997).
157. Badie, C. *et al.* Defective repair of DNA double-strand breaks and chromosome damage in fibroblasts from a radiosensitive leukemia patient. *Cancer Res.* 55:1232-1234 (1995).
158. Allalunis-Turner, M. *et al.* Isolation of two cell lines from a human malignant glioma specimen differing in sensitivity to radiation and chemotherapeutic drugs. *Radiat. Res.* 134:349-354 (1993).
159. Foray, N. *et al.* Gamma-rays-induced death of human cells carrying mutations of brca1 or brca2. *Oncogene* 18:7334-7342 (1999).
160. Joubert, A. *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.* 84:1–19 (2008).
161. Foray, N. & Verrelle, P. [DNA repair and repair diseases: Between molecular models and clinical reality]. *Bull. Cancer* 98:257-275 (2011).
162. Cornforth, M. & Bedford, J. A quantitative comparison of potentially lethal damage repair and the rejoining of interphase chromosome breaks in low passage normal human fibroblasts. *Radiat. Res.* 111:385-405 (1987).
163. Bodgi, L. *et al.* A single formula to describe radiation-induced protein relocalization: Towards a mathematical definition of individual radiosensitivity. *J. Theor. Biol.* **333:135–14**, (2013).
164. Ager, D. & Dewey, W. Calibration of pulsed field gel electrophoresis for measurement of DNA double-strand breaks. *Int. J. Radiat. Biol.* 58:249-259 (1990).
165. Iliakis, G., Pantelias, G., Okayasu, R. & Seaner, R. 125idurd-induced chromosome fragments, assayed by premature chromosome condensation, and DNA double-strand breaks have similar repair kinetics in g1-phase cho-cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 52:705-722 (1987).
166. Granzotto, A. *et al.* Individual response to ionising radiation : What predictive assay(s) to choose? *Comptes Rendus l'Académie des Sci.* 334:140–157 (2011).
167. 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.* 100:5057-5062 (2003).
168. Renier, W. *et al.* Consequences of the bleed-through phenomenon in immunofluorescence of proteins forming radiation-induced nuclear foci. *Int. J. Radiat. Biol.* 83:543-549 (2007).
  169. Joubert, A. & Foray, N. [intrinsic radiosensitivity and DNA double-strand breaks in human cells]. *Cancer Radiother.* 11:129-142 (2007).
  170. Foray, N. *et al.* A subset of atm- and atr-dependent phosphorylation events requires the brca1 protein. *EMBO J.* 22:2860-2871 (2003).
  171. Zhou, B. & Elledge, S. The DNA damage response: Putting checkpoints in perspective. *Nature* 408:433-439 (2000).
  172. Khanna, K. & Jackson, S. DNA double-strand breaks: Signaling, repair and the cancer connection. *Nat. Genet.* 27:247-254 (2001).
  173. Shiloh, Y. ATM and ATR : Networking cellular responses to DNA damage. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11:71-77 (2001).
  174. Smith, G. & Jackson, S. The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev.* 13:916-934. (1999).
  175. Rogakou, E., Pilch, D., Orr, A., Ivanova, V. & Bonner, W. DNA double-stranded breaks induce histone h2ax phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* 273:5858-5868. (1998).
  176. Brown, E. & Baltimore, D. Essential and dispensable roles of atr in cell cycle arrest and genome maintenance. *Genes Dev.* 17:615-628 (2003).
  177. Burma, S., Chen, B., Murphy, M., Kurimasa, A. & Chen, D. Atm phosphorylates histone h2ax in response to DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* 276:42462-42467. (2001).
  178. Rogakou, E., Boon, C., Redon, C. & Bonner, W. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 146:905-916 (1999).
  179. Sedelnikova, O., Rogakou, E., Panyutin, I. & Bonner, W. Quantitative detection of (125)iodo-induced DNA double-strand breaks with gamma-h2ax antibody. *Radiat. Res.* 158:486-492 (2002).
  180. Hyagarajan, B., McCormick-Graham, M., Romero, D. & Campbell, C. Characterization of homologous DNA recombination activity in normal and immortal mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 24:4084-4091 (1996).
  181. Hrlich, S. *et al.* Mechanisms of illegitimate recombination. *Gene* 135:161-166 (1993).
  182. Wu, L., Davies, S., Levitt, N. & Hickson, I. Potential role for the blm helicase in recombinational repair via a conserved interaction with rad51. *J. Biol. Chem.* 276:19375-19381 (2001).
  183. Lengauer, C., Kinzler, K. & Vogelstein, B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396:643-649 (1998).
  184. Zhou, Z., Akgun, E. & Jasin, M. Repeat expansion by homologous recombination in the mouse germ line at palindromic sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:8326-8333 (2001).
  185. Walker, J., Corpina, R. & Goldberg, J. Structure of the ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* 412:607-614 (2001).
  186. Dai, Y. *et al.* Nonhomologous end joining and v(dj) recombination require an additional factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:2462-2467 (2003).
  187. Joubert, A. & Foray, N. Repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in human cells: History, progress and controversies. *Landseer BR, Ed. New Res. DNA repair Nov. Sci. Publ.* (2006).
  188. Savitsky, K. *et al.* The complete sequence of the coding region of the atm gene reveals

- similarity to cell cycle regulators in different species. *Hum. Mol. Genet.* 4:2025-2032 (1995).
189. Bakkenist, C. & Kastan, M. DNA damage activates atm through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421:499-506 (2003).
  190. Zhao, S. *et al.* Functional link between ataxia-telangiectasia and nijmegen breakage syndrome gene products. *Nature* 405:473-477 (2000).
  191. Lee, J. & Paull, T. Direct activation of the atm protein kinase by the mre11/rad50/nbs1 complex. *Science (80-. )*. 304:93–96 (2004).
  192. Watters, D. *et al.* Cellular localisation of the ataxia-telangiectasia (atm) gene product and discrimination between mutated and normal forms. *Oncogene* 14:1911-1921 (1997).
  193. Brown, K. *et al.* The ataxia-telangiectasia gene product, a constitutively expressed nuclear protein that is not up-regulated following genome damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:1840-1845 (1997).
  194. Barlow, C. *et al.* Atm is a cytoplasmic protein in mouse brain required to prevent lysosomal accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:871-876 (2000).
  195. Oka, A. & Takashima, S. Expression of the ataxia-telangiectasia gene (atm) product in human cerebellar neurons during development. *Neurosci. Lett.* 252:195–198 (1998).
  196. Shiloh, Y., Tabor, E. & Becker, Y. Colony-forming ability of ataxia-telangiectasia skin fibroblasts is an indicator of their early senescence and increased demand for growth factors. *Exp. cell researc* 140:191-199 (1982).
  197. Bar, R. *et al.* Extreme insulin resistance in ataxia telangiectasia: Defect in affinity of insulin receptors. *N. Engl. J. Med.* 298:1164-1171 (1978).
  198. McKinnon, P. & Burgoyne, L. Altered cellular morphology and microfilament array in ataxia-telangiectasia fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.* 39:161-166. (1985).
  199. Ammann, A., Cain, W., Ishizaka, K., Hong, R. & Good, R. Immunoglobulin e deficiency in ataxia-telangiectasia. *N. Engl. J. Med.* 281:469-472 (1969).
  200. Rhodes, N. *et al.* Defective potassium currents in ataxia telangiectasia fibroblasts. *Genes Dev.* 12:3686-3692 (1998).
  201. Young, D. *et al.* Identification of domains of ataxia-telangiectasia mutated required for nuclear localization and chromatin association. *J. Biol. Chem.* 280:27587-27594 (2005).
  202. Duque-Parra, J. Note on the origin and history of the term ‘apoptosis’. *Anat. Rec. Part B, New Anat.* 283:2–4 (2005).
  203. Foray, N. [claudius regaud (1870-1940): A pioneer of radiobiology and radiotherapy]. *Cancer Radiother.* 16:315-321 (2012).
  204. Foray, N., Arlett, C. & Malaise, E. Radiation-induced DNA double-strand breaks and the radiosensitivity of human cells: A closer look. *Biochimie* 79:567-575 (1997).
  205. Puck, T. & Marcus, P. Action of x-rays on mammalian cells. *J. Exp. Med.* 103:653-666 (1956).
  206. Chaurasia, M., Bhatt, A., Das, A., Dwarakanath, B. & Sharma, K. Radiation-induced autophagy: Mechanisms and consequences. *Free Radic. Res.* 50:273-290 (2016).
  207. White, E. Entosis: It’s a cell-eat-cell world. *Cell* 131:840-842 (2007).
  208. D’Amico, A. & McKenna, W. Apoptosis and a re-investigation of the biologic basis for cancer therapy. *Radiother. Oncol.* 33:3–10 (1994).
  209. Bursch, W., Kleine, L. & Tenniswood, M. The biochemistry of cell death by apoptosis. *Biochem. Cell. Biol.* 68:1071-1074 (1990).
  210. Walker, P., Kokileva, L., LeBlanc, J. & Sikorska, M. Detection of the initial stages of DNA fragmentation in apoptosis. *Biotechniques* 15:1032-1040 (1993).
  211. Lowe, S., Schmitt, E., Smith, S., Osborne, B. & Jacks, T. P53 is required for radiation-

- induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362:847-849 (1993).
212. Di Leonardo, A., Linke, S., Clarkin, K. & Wahl, G. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent g1 arrest and long-term induction of cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* 8:2540-2551 (1994).
  213. Li, C., Nagasawa, H., Dahlberg, W. & Little, J. Diminished capacity for p53 in mediating a radiation-induced g1 arrest in established human tumor cell lines. *Oncogene* 1:1885-1892 (1995).
  214. Jeggo, P. & Lobrich, M. DNA double-strand breaks: Their cellular and clinical impact? *Oncogene* 26:7717-7719 (2007).
  215. Joubert, A. *et al.* Biologie des radiations : avancées majeures et perspectives pour la radiothérapie. *Cancer/Radiothérapie* **15**, 348–354 (2011).
  216. Foray, N., Bourguignon, M. & Hamada, N. Individual response to ionizing radiation. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 770(pt B):369–386 (2016).
  217. Joubert, A. & Foray, N. Repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in human cells: History, progress and controversies. *Landseer BR, Ed. New Res. DNA repair. Hauppauge N. Y. Nov. Sci. Publ. Inc. pp. Chapter 10* (2006).
  218. Bennett, L., Brownlee, H., Hagavik, S. & Wiseman, R. Sequence analysis of the rat brca1 homolog and its promoter region. *Mamm. Genome* 10:19-25 (1999).
  219. Despeignes, V. Observation concernant un cas de cancer de l'estomac traité par les rayons roentgen. *Lyon Med.* 428-430. (1896).
  220. 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 Sess. l'Association Française pour l'Avancement des Sci. 40ème Congrès - Dijon* 942–947 (1911).
  221. Foray, N. [leon bouchacourt (1865-1949): How an obstetrician pointed out individual radiosensitivity]. *Cancer Radiother.* 19:752-761 (2015).
  222. Foray, N., Colin, C. & Bourguignon, M. 100 years of individual radiosensitivity: How we have forgotten the evidence. *Radiology* 264:627-631 (2012).
  223. Curie, P. & Becquerel, H. Action physiologique des rayons du radium. *Comptes Rendus l'Académie des Sci.* 82:1289 (1901).
  224. Bergonié, J. & Tribondeau, L. Interprétation de quelques résultats de la radiothérapie et essai de fixation d'une technique rationnelle. *Comptes-rendus l'Académie des Sci.* 143:983-984 (1906).
  225. Vogin, G. & Foray, N. The law of bergonie and tribondeau: A nice formula for a first approximation. *Int. J. Radiat. Biol.* (2012).
  226. Wetterer, J. La radiothérapie des néoplasmes sous-cutanées. *Arch. d'Electricité Médicale* 18:229-240 (1910).
  227. Foray, N. [victor despeignes (1866-1937): How a hygienist became the first radiation oncologist]. *Cancer Radiother.* 17:244-254 (2013).
  228. Schiff, E. & Freund, L. Contribution à l'étude de la radiothérapie. *Ann. d'Electrobiologie* 1:468-482 (1898).
  229. AFplAd, S. Association française pour l'avancement des sciences. *Compte-rendu la 35ème Sess. - Electr. médicale. Masson, Ed. Lyon* 243–248 (1906).
  230. Bergonié, J. & Tribondeau, L. Actions des rayons x sur le testicule du rat blanc. *Comptes-Rendus la Société Biol.* 57:400-402 (1904).
  231. Hoerni, B. Jean bergonié. *Paris Ed. Glyphe* (2007).
  232. Arcelin, F. Existe-t-il en radiothérapie des idiosyncrasies spontanées ou acquises. *Arch. d'Electricité Médicale* 10:37-61 (1911).
  233. Plowman, P., Bridges, B., Arlett, C., Hinney, A. & Kingston, J. An instance of clinical radiation morbidity and cellular radiosensitivity, not associated with ataxia-



- telangiectasia. *Br. J. Radiol.* 63:624-628 (1990).
234. Pritchard, J. *et al.* The effect of radiation therapy for hodgkin's disease in a child with ataxia telangiectasia : A clinical, biological and pathologic study. *Cancer* 50:877-886 (1982).
  235. Morgan, J., Holcomb, T. & Morrissey, R. Radiation reaction in ataxia telangiectasia. *Am. J. Dis. Child.* 116:557-558 (1986).
  236. Pietrucha, B. *et al.* Ataxia-telangiectasia with hyper-igm and wilms tumor: Fatal reaction to irradiation. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 32:e28-30 (2010).
  237. Ash, D. Lessons from epinal. *Clin. Oncol.* 19:614-615 (2007).
  238. Peiffert, D., Simon, J. & Eschwege, F. [epinal radiotherapy accident: Passed, present, future]. *Cancer Radiother.* 11:309-312 (2007).
  239. Burnet, N., Johansen, J., Turesson, I., Nyman, J. & Peacock, J. Describing patients' normal tissue reactions: Concerning the possibility of individualising radiotherapy dose prescriptions based on potential predictive assays of normal tissue radiosensitivity. *Int. J. cancer* 79:606-613 (1998).
  240. ICRP - International Commition of Radioloy Protection. Recommendations of the international commission on radiological protection. Icrp publication 103. *Ann. ICRP* 37:1-332 (2007).
  241. ICRP - International Commition of Radioloy Protection. Avoidance of radiation injuries from medical interventional procedures Publication 85. *Ann. ICRP* 30:1-72 (2000).
  242. Autorité de Sureté Nucléaire. 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).
  243. Syllaba, L. & Hennen, K. Contribution à l'indépendance de l'athétose double idiopathique et congénitale. Atteinte familiale, syndrome dystrophique, signe du réseau vasculaire conjonctival, intégrité psychique. *Rev. Neurol.* 5:541-562 (1926).
  244. Louis-Bar, M. Sur un syndrome progressif comprenant des telangiectasies capillaires cutanées et conjonctivales symétriques, à disposition naevoïde et des troubles cérébelleux. *Confin. Neurol.* 4:32-43 (1941).
  245. Jorgensen TJ, S. Y. The atm gene and the radiobiology of ataxia-telangiectasia. *Int. J. Radiat. Biol.* 69:527-537 (1996).
  246. McKinnon, P. Ataxia-telangiectasia: An inherited disorder of ionizing-radiation sensitivity in man. Progress in the elucidation of the underlying biochemical defect. *Hum. Genet.* 75:197-208 (1987).
  247. Bunday, S. Clinical and genetic features of ataxia-telangiectasia. *Int. J. Radiat. Biol.* **66:S23-29**, (1994).
  248. Aurias, A. Ataxia-télangiectasie : Aspects cliniques épidémiologiques et génétiques. *Médecine/Sciences* 10:957-961 (1994).
  249. Taylor, A. *et al.* Ataxia telangiectasia: A human mutation with abnormal radiation sensitivity. *Nature* 258:427-429 (1975).
  250. Painter, R. & Young, B. Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: A new explanation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77:7315-7317. (1980).
  251. Houldsworth, J. & Lavin, M. Effect of ionizing radiation on DNA synthesis in ataxia telangiectasia cells. *Nucleic Acids Res.* 8:3709-3720 (1980).
  252. Swift, M., Morrell, D., Massey, R. & Chase, C. Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia. *N. Engl. J. Med.* 325:1831-1836 (1991).
  253. O'Driscoll, M., Ruiz-Perez, V., Woods, C., Jeggo, P. & Goodship, J. A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and rad3-related protein (atr) results in seckel syndrome. *Nat. Genet.* 33:497-501 (2003).

254. Lees-Miller, S. *et al.* Absence of p350 subunit of DNA-activated protein kinase from a radiosensitive human cell line. *Science* (80-. ). 267:1183-1185 (1995).
255. van der Burg, M. *et al.* A DNA-pkcs mutation in a radiosensitive t-b- scid patient inhibits artemis activation and nonhomologous end-joining. *J. Clin. Invest.* 119:91–98 (2009).
256. van der Burg, M., van Dongen, J. & van Gent, D. DNA-pkcs deficiency in human: Long predicted, finally found. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 9:503-509 (2009).
257. Liu, Y. *et al.* Polymorphisms of lig4 and xrcc4 involved in the nhej pathway interact to modify risk of glioma. *Hum. Mutat.* 29:381-389 (2008).
258. O’Driscoll, M., Gennery, A., Seidel, J., Concannon, P. & Jeggo, P. An overview of three new disorders associated with genetic instability: Lig4 syndrome, rs-scid and at-seckel syndrome. *DNA Repair (Amst).* 3:1227-1235 (2004).
259. O’Driscoll, M. *et al.* DNA ligase iv mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency. *Mol. Cell* 8:1175-1185 (2001).
260. Moshous, D. *et al.* Artemis, a novel DNA double-strand break repair/v(d)j recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell* 105:177-186 (2001).
261. Goodarzi, A. *et al.* DNA-pk autophosphorylation facilitates artemis endonuclease activity. *EMBO J.* 25:3880-3889 (2006).
262. Buck, D. *et al.* Severe combined immunodeficiency and microcephaly in siblings with hypomorphic mutations in DNA ligase IV. *Eur J Immunol* 36:224-235 (2006).
263. Ahnesorg, P., Smith, P. & Jackson, S. Xlf interacts with the xrcc4-DNA ligase iv complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* 124:301-313 (2006).
264. Stewart, G. *et al.* Riddle immunodeficiency syndrome is linked to defects in 53bp1-mediated DNA damage signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:16910-16915 (2007).
265. FitzGerald, J., Grenon, M. & Lowndes, N. 53bp1: Function and mechanisms of focal recruitment. *Biochem. Soc. Trans.* 37:897-904 (2009).
266. Weemaes, C. *et al.* A new chromosomal instability disorder: The nijmegen breakage syndrome. *Acta Paediatr. Scand.* 70:557-564 (1981).
267. Taalman, R. *et al.* Further delineation of the nijmegen breakage syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 32:425-431 (1989).
268. Taalman, R., Jaspers, N., Scheres, J., De Wit, J. & Hustinx, T. Hypersensitivity to ionizing radiation, in vitro, in a new chromosomal breakage disorder, the nijmegen breakage syndrome. *Mutat. Res.* 112:23–32 (1983).
269. Antoccia, A., Ricordy, R., Maraschio, P., Prudente, S. & Tanzarella, C. Chromosomal sensitivity to clastogenic agents and cell cycle perturbations in nijmegen breakage syndrome lymphoblastoid cell lines. *Int. J. Radiat. Biol.* 71:41–49 (1997).
270. Tewart, G. *et al.* The DNA double-strand break repair gene hmre11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell* 99:577-587 (1997).
271. Alsbeih, G., Al-Hadyan, K. & Al-Harbi, N. Assessment of carriers’ frequency of a novel mre11 mutation responsible for the rare ataxia telangiectasia-like disorder. *Genet. Tests* 12:387-389 (2008).
272. Fernet, M. *et al.* Identification and functional consequences of a novel mre11 mutation affecting 10 saudi arabian patients with the ataxia telangiectasia-like disorder. *Hum. Mol. Genet.* 14:307-318 (2005).
273. Waltes, R. *et al.* Human rad50 deficiency in a nijmegen breakage syndrome-like disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 84:605-616 (2009).
274. Ramirez, C., Cadinanos, J., Varela, I., Freije, J. & Lopez-Otin, C. Human progeroid syndromes, aging and cancer: New genetic and epigenetic insights into old questions.

- Cell. Mol. Life Sci.* 64:155-170 (2007).
275. Varela, I. *et al.* Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging. *Nat. Med.* 14:767-772 (2008).
  276. Feunteun, J. [a paradox and three enigmas about the role of brca1 in breast and ovarian cancers]. *J. la Société Biologique* 198:123–126 (2004).
  277. Huen MS, Sy SM, C. J. Brca1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat. Rev. Mol. cell Biol.* 11:138-148 (2010).
  278. Scully, R. & Puget, N. Brca1 and brca2 in hereditary breast cancer. *Biochimie* 84:95-102 (2002).
  279. Ramus, S. & Gayther, S. The contribution of brca1 and brca2 to ovarian cancer. *Mol. Oncol.* 3:138-150 (2009).
  280. Garcia, M. *et al.* 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* 30:1898-1902 (2009).
  281. Papadopoulo, D. & Moustacchi, E. [fanconi anemia: Genes and function(s) revisited]. *Médecine Sci.* 21:730-736 (2005).
  282. Howlett, N. *et al.* Biallelic inactivation of brca2 in fanconi anemia. *Science* (80- ). 297:606-609 (2002).
  283. 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).
  284. Petit, C. & Sancar, A. Nucleotide excision repair: From e. Coli to man. *Biochimie* 81:15–25 (1999).
  285. Lambert, W., Gagna, C. & Lambert, M. Xeroderma pigmentosum: Its overlap with trichothiodystrophy, cockayne syndrome and other progeroid syndromes. *Adv. Exp. Med. Biology* 637:128–137 (2008).
  286. Zhang, Y., Rohde, L. & Wu, H. Involvement of nucleotide excision and mismatch repair mechanisms in double strand break repair. *Curr. Genomics* 10:250-258 (2009).
  287. Bellizzi, A. & Frankel, W. Colorectal cancer due to deficiency in DNA mismatch repair function: A review. *Adv. Anat. Pathol.* 16:405-417 (2009).
  288. Half, E., Bercovich, D. & Rozen, P. Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J Rare Dis* 4:22 (2009).
  289. Petit, C. Usher syndrome: From genetics to pathogenesis. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2:271-297 (2001).
  290. Rothkamm, K. & Lobrich, M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *PNAS* 100, 1–6 (2003).
  291. Rénier, W. *et al.* Consequences of the bleed-through phenomenon in immunofluorescence of proteins forming radiation-induced nuclear foci. *Int. J. Radiat. Biol.* 83, 543–549 (2007).
  292. Ferlazzo, M. *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.* 49:1200-1211 (2014).
  293. Granzotto, A. *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.* 94, (2016).
  294. Pereira, S. *et al.* Fast and Binary Assay for Predicting Radiosensitivity Based on the Theory of ATM Nucleo-Shuttling: Development, Validation, and Performance. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 100, 353–360 (2018).

295. Bakkenist, C. J. & Kastan, M. B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**, 499–506 (2003).
296. Bencokova, Z. *et al.* Radiobiological characterization of neurofibromatosis type I : the neurofibromin protein impacts on the ATM-dependent DNA damage repair and signaling pathway. In press. *Mol. Neurobiol.* (2018).
297. Ferlazzo, M. L. *et al.* Radiobiological Characterization of Tuberous Sclerosis: a Delay in the Nucleo-Shuttling of ATM May Be Responsible for Radiosensitivity. *Mol. Neurobiol.* **55**, 4973–4983 (2018).
298. Ferlazzo, M. *et al.* Some mutations in the xeroderma pigmentosum D gene may lead to moderate but significant radiosensitivity associated with a delayed radiation-induced ATM nuclear localization. *Int. J. Radiat. Biol.* **Nov 26**, 1–17 (2019).
299. Grudzenski, S., Raths, A., Conrad, S., Rube, C. E. & Lobrich, M. Inducible response required for repair of low-dose radiation damage in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 14205–14210 (2010).
300. Calabrese, E. J. Hormesis : a fundamental concept in biology. *Microb. Cell* **1**, 1–5 (2014).
301. Calabrese, E. J. *et al.* Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **222**, 122–128 (2007).
302. Devic, C., Ferlazzo, M. & Foray, N. Influence of Individual Radiosensitivity on the Adaptive Response Phenomenon : Toward a Mechanistic Explanation Based on the Nucleo-Shuttling of ATM Protein. *Dose-Response* **Auguste**, 1–11 (2018).
303. Devic, C., Ferlazzo, M., Berthel, E. & Foray, N. Influence of individual radiosensitivity on the hormesis phenomenon : towards a mechanistic explanation based on the nucleoshuttling of ATM protein. *dose response* **accepted i**, (2020).
304. Schwab, M. Encyclopedia of cancer. *Heidelberg, Ger. Springer* **2011**,
305. Schwab, M. Encyclopedia of Cancer. *Heidelberg, Ger. Springer* (2011).
306. Olivieri, G., Bodycote, J. & Wolff, S. Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science (80-. )*. 223(4636):594-597 (1984).
307. Calabrese, E. *et al.* Biological stress response terminology: integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose- response framework. *Toxicol Appl Pharmacol* 222(1): 122–128. (2007).
308. Joiner, M., Lambin, P. & Marples, B. Adaptive response and induced resistance. *C R Acad Sci III* 322(2-3):167-175 (1999).
309. Southam, C. & Ehrlich, J. Effects of extract of western red-cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture. *Phytopathology* 33:517-524 (1943).
310. Luckey, T. Hormesis With Ionizing radiation. *New York, NY CRC Press* (1980).
311. Calabrese, E. Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists. *Env. Toxicol Chem* 27(7):1451-1474 (2008).
312. Chen, W. L. *et al.* Effects of cobalt-60 exposure on health of Taiwan residents suggest new approach needed in radiation protection. *Dose. Response.* 178 (2007). doi:10.2203/dose-response.06-105.chen
313. Rithidech, K. N. & Scott, B. R. Evidence for radiation hormesis after in vitro exposure of human lymphocytes to low doses of ionizing radiation. *Dose-Response* **6**, 252–271 (2008).
314. Calabrese, E. & Baldwin, L. Radiation hormesis: its historical foundations as a biological hypothesis. *Hum. Exp Toxicol* 19(1):41-75 (2000).
315. Raaphorst, G. & Boyden, S. Adaptive response and its variation in human normal and tumour cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 75(7): 865-873 (1999).
316. Bosi, A. & Olivieri, G. Variability of the adaptive response to ionizing radiations in

- humans. *Mutat. Res.* 211(1):13–17 (1989).
317. Wolff, S., Afzal, V., Wiencke, J., Olivieri, G. & Michaeli, A. Human lymphocytes exposed to low doses of ionizing radiations become refractory to high doses of radiation as well as to chemical mutagens that induce double-strand breaks in DNA. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 53(1): 39–47 (1988).
  318. Wiencke, J., Afzal, V., Olivieri, G. & Wolff, S. Evidence that the [3H]thymidine-induced adaptive response of human lymphocytes to subsequent doses of X-rays involves the induction of a chromosomal repair mechanism. *Mutagenesis* 1(5): 375-380 (1986).
  319. Shadley, J., Afzal, V. & Wolff, S. Characterization of the adaptive response to ionizing radiation induced by low doses of X rays to human lymphocytes. *Radiat. Res.* 111(3):511-517 (1987).
  320. Shadley, J. & Wiencke, J. Induction of the adaptive response by X-rays is dependent on radiation intensity. *Int. J. Radiat. Biol.* 56(1):107-118 (1989).
  321. Shadley, J. & Wolff, S. Very low doses of X-rays can cause human lymphocytes to become less susceptible to ionizing radiation. *Mutagenesis* 2(2):95-96 (1987).
  322. Sanderson, B. & Morley, A. Exposure of human lymphocytes to ionizing radiation reduces mutagenesis by subsequent ionizing radiation. *Mutat. Res.* 164(6):347-351 (1986).
  323. Sankaranarayanan, K., Von Duyn, A., Loos, M. & Natarajan, A. Adaptive response of human lymphocytes to low-level radiation from radioisotopes or X-rays. *Mutat. Res.* 211(1):7–12 (1989).
  324. Kelsey, K., Memisoglu, A., Frenkel, D. & Liber, H. Human lymphocytes exposed to low doses of X-rays are less susceptible to radiation-induced mutagenesis. *Mutat. Res.* 263(4):197–201 (1991).
  325. Redpath, J. & Antoniono, R. Induction of an adaptive response against spontaneous neoplastic transformation in vitro by low-dose gamma radiation. *Radiat. Res.* 149(5):517-520 (1998).
  326. Cregan, S., Brown, D. & Mitchel, R. Apoptosis and the adaptive response in human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 75(9): 1087-1094 (1999).
  327. Shadley, J. & Dai, G. Cytogenetic and survival adaptive responses in G1 phase human lymphocytes. *Mutat. Res.* 265(2): 273-281. (1992).
  328. Rigaud, O. & Moustacchi, E. Radioadaptation to the mutagenic effect of ionizing radiation in human lymphoblasts: molecular analysis of HPRT mutants. *Mutat. Res.* 54(7 suppl):1924s-1928s (1994).
  329. Seong, J., Suh, C. & Kim, G. Adaptive response to ionizing radiation induced by low doses of gamma rays in human cell lines. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 33(4):869-874 (1995).
  330. Joiner, M. *et al.* Hypersensitivity to very-low single radiation doses: its relationship to the adaptive response and induced radioresistance. *Mutat. Res.* 358(2): 171–183 (1996).
  331. Ueno, A., Vannais, D., Gustafson, D., Wong, J. & Waldren, C. A low, adaptive dose of gamma-rays reduced the number and altered the spectrum of S1- mutants in human-hamster hybrid AL cells. *Mutat. Res.* 358(2):161–169 (1996).
  332. Boothman, D., Meyers, M., Odegaard, E. & Wang, M. Altered G1 checkpoint control determines adaptive survival responses to ionizing radiation. *Mutat. Res.* 358(2):143–153 (1996).
  333. Salone, B., Grillo, R., Aillaud, M., Bosi, A. & Olivieri, G. Effects of low-dose (2 cGy) X-ray on cell-cycle kinetics and on induced mitotic delay in human lymphocyte. *Mutat. Res.* 351(2):193–197 (1996).

334. Filippovich, I., Sorokina, N., Robillard, N., Lisbona, A. & Chatal, J. Radiation-induced apoptosis in human tumor cell lines: adaptive response and split-dose effect. *Int. J. Cancer* 77(1):76-81 (1998).
335. Chen, Z. & Sakai, K. Enhancement of radiation-induced apoptosis by preirradiation with low-dose X-rays in human leukemia MOLT-4 cells. *J. Radiat. Res.* 45(2):239-243 (2004).
336. Hauptmann, M. *et al.* Differential response and priming dose effect on the proteome of human fibroblast and stem cells induced by exposure to low doses of ionizing radiation. *Radiat. Res.* 185(3):299-312 (2016).
337. Zhao, Y. *et al.* Ionizing radiation- induced adaptive response in fibroblasts under both monolayer and 3-dimensional conditions. *PLoS One* 10(3):e0121289 (2015).
338. Ye, S., Yuan, D., Xie, Y., Pan, Y. & Shao, C. Role of DNA methylation in long-term low-dose gamma-rays induced adaptive response in human B lymphoblast cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 89(11): 898-906 (2013).
339. Gajendiran, N., Tanaka, K., Kumaravel, T. & Kamada, N. Neutron- induced adaptive response studied in go human lymphocytes using the comet assay. *J. Radiat. Res.* 42(1):91-101 (2001).
340. Stoilov, L., Mullenders, L., Darroudi, F. & Natarajan, A. Adaptive response to DNA and chromosomal damage induced by X-rays in human blood lymphocytes. *Mutagenesis* 22(2):117-122 (2007).
341. Shelke, S. & Das, B. Dose response and adaptive response of non- homologous end joining repair genes and proteins in resting human peripheral blood mononuclear cells exposed to gamma radiation. *Mutagenesis* 30(3):365-379 (2015).
342. Dieriks, B., De Vos, W., Baatout, S. & Van Oostveldt, P. Repeated exposure of human fibroblasts to ionizing radiation reveals an adaptive response that is not mediated by interleukin-6 or TGF- beta. *Mutat. Res.* 715(1-2):19-24 (2011).
343. Toprani, S. & Das, B. Radio-adaptive response of base excision repair genes and proteins in human peripheral blood mononuclear cells exposed to gamma radiation. *Mutagenesis* 30(5): 663-676. (2015).
344. Park, H. *et al.* Role of AKT and ERK pathways in controlling sensitivity to ionizing radiation and adaptive response induced by low-dose radiation in human immune cells. *Eur. J. Cell Biol.* 94(12):653-660 (2015).
345. Pretazzoli, V., Salone, B., Bosi, A. & Olivieri, G. Variability of G(2) checkpoint sensitivity to low doses of X-rays (2 cGy): correlation with G(2) chromatid aberrations but not with an adaptive response. *Mutagenesis* 15(6):531-535 (2000).
346. Mothersill, C., Seymour, C. & Joiner, M. Relationship between radiation-induced low-dose hypersensitivity and the bystander effect. *Radiat. Res.* 157(5):526-532 (2002).
347. Broome, E., Brown, D. & Mitchel, R. Dose responses for adaption to low doses of (60)Co gamma rays and (3)H beta particles in normal human fibroblasts. *Radiat. Res.* 158(2):181-186 (2002).
348. Ryan, L., Seymour, C., Joiner, M. & Mothersill, C. Radiation- induced adaptive response is not seen in cell lines showing a bystander effect but is seen in lines showing HRS/IRR response. *Int. J. Radiat. Biol.* 85(1):87-95 (2009).
349. Toprani, S. & Das, B. Role of base excision repair genes and proteins in gamma-irradiated resting human peripheral blood mono- nuclear cells. *Mutagenesis* 30(2):247-261 (2015).
350. Manesh, S., Sangsuwan, T., Wojcik, A. & Haghdoost, S. Studies of adaptive response and mutation induction in MCF-10A cells following exposure to chronic or acute ionizing radiation. *Mutat. Res.* 780:55-59 (2015).
351. Joubert, A. *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.* 84(2):107-125 (2008).
352. Deschavanne, P. & Fertil, B. A review of human cell radiosensitivity in vitro. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 34(1):251-266 (1996).
  353. Hart, J. & Hyun, S. Cancer mortality, state mean elevations, and other selected predictors. *Dose-Response* **10**, 58–65 (2012).
  354. Fornalski, K. W. & Dobrzyński, L. The cancer mortality in high natural radiation areas in Poland. *Dose-Response* **10**, 541–561 (2012).
  355. Lehrer, S. & Rosenzweig, K. Lung Cancer Hormesis in High Impact States Where Nuclear Testing Occurred. *Clin Lung Cancer* **17**, 139–148 (2015).
  356. Liang, X. *et al.* Low-Dose Radiation Induces Cell Proliferation in Human Embryonic Lung Fibroblasts but not in Lung Cancer Cells: Importance of ERK1/2 and AKT Signaling Pathways. *Dose. Response.* 14(1):1559325815622174 (2016).
  357. Lehrer, S., Green, S. & Rosenzweig, K. E. Reduced Ovarian Cancer Incidence in Women Exposed to Low Dose Ionizing Background Radiation or Radiation to the Ovaries after Treatment for Breast Cancer or Rectosigmoid Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* **17**, 2979–2982 (2016).
  358. Yang, G. *et al.* Distinct biological effects of low-dose radiation on normal and cancerous human lung cells are mediated by ATM signaling. *Oncotarget* **7**, 71856–71872 (2016).
  359. Kojima, S. *et al.* Treatment of cancer and inflammation with low-dose ionizing radiation: Three case reports. *Dose-Response* **15**, 1–7 (2017).
  360. Wang, Y., Li, Y., Yang, L. & Yin, D. Intermittent low dose irradiation enhances the effectiveness of radio-and chemo-therapy for human colorectal adenocarcinoma cell line HT-29. *Oncol. Rep.* **38**, 591–597 (2017).
  361. Li, S. J. *et al.* Low-dose irradiation inhibits proliferation of the p53null type human prostate cancer cells through the ATM/p21 pathway. *Int. J. Mol. Med.* **41**, 548–554 (2018).
  362. Vieira Dias, J. *et al.* Gamma Low-Dose-Rate Ionizing Radiation Stimulates Adaptive Functional and Molecular Response in Human Aortic Endothelial Cells in a Threshold-, Dose-, and Dose Rate-Dependent Manner. *Dose-Response* **16**, 1–13 (2018).
  363. Kato, H., Schull, W., Awa, A., Akiyama, M. & Otake, M. Dose-response analyses among atomic bomb survivors exposed to low-level radiation. *Health Phys.* 52:645-652 (1987). doi:10.1080/00139157.1975.9929567
  364. Kojima, S. *et al.* Recovery from rheumatoid arthritis following 15 months of therapy with low doses of ionizing radiation: A case report. *Dose-Response* **16**, 1–7 (2018).
  365. Kuciel-Lewandowska, J. M., Pawlik-Sobecka, L., Płaczkowska, S., Kokot, I. & Paprocka-Borowicz, M. The assessment of the integrated antioxidant system of the body and the phenomenon of spa reaction in the course of radon therapy: A pilot study. *Adv. Clin. Exp. Med.* **27**, 1341–1346 (2018).
  366. Gaetani, S. *et al.* DNA damage response in workers exposed to low-dose ionising radiation. *Occup. Environ. Med.* **75**, 724–729 (2018).
  367. Mine, M., Okumura, Y., Ichimaru, M., Nakamura, T. & Kondo, S. Apparently beneficial effect of low to intermediate doses of A-bomb radiation on human lifespan. *Int. J. Radiat. Biol.* 58:1035-1043 (1990).
  368. Palm, S. *et al.* Effects of the alpha-particle emitter At-211 and low-dose-rate gamma-radiation on the human cell line Colo-205 as studied with a growth assay. *Anticancer Res.* 18:1671-1676 (1998).
  369. Lee, Y. *et al.* Peripheral blood cells among community residents living near nuclear power plants. *Sci Total Env.* 280(1-3):165-172 (2001).

370. Gamulin, M. *et al.* DNA and cytogenetic damage in white blood cells of postmenopausal breast cancer patients treated with radiotherapy. *J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng.* **45**, 292–304 (2010).
371. Monfared, A. S., Hajian, K., Hosseini, R. & Nasir, A. Association between local external gamma rays and frequency of cancer in babol-Iran. *Dose-Response* **8**, 368–377 (2010).
372. Thompson, R. E. Epidemiological evidence for possible radiation hormesis from radon exposure: A case-control study conducted in Worcester, MA. *Dose-Response* **9**, 59–75 (2011).
373. Hart, J. Cancer mortality for a single race in low versus high elevation counties in the U.S. *Dose-Response* **9**, 348–355 (2011).
374. Velegzhaninov, I. O., Ermakova, A. V. & Klovov, D. Y. Low dose ionizing irradiation suppresses cellular senescence in normal human fibroblasts. *Int. J. Radiat. Biol.* **94**, 825–828 (2018).
375. Doss, M. Evidence supporting radiation hormesis in atomic bomb survivor cancer mortality data. *Dose-Response* **10**, 584–592 (2012).
376. Ozasa, K. *et al.* Studies of the mortality of atomic bomb survivors, Report 14, 1950–2003: an overview of cancer and noncancer diseases. *Radiat. Res.* **177**, 229–243 (2012).
377. Shimizu, Y., Schull, W. J. & Kato, H. Cancer risk among atomic bomb survivors. The RERF Life Span Study. Radiation Effects Research Foundation. *JAMA* **264**(5):601–604. (1990).
378. Holzman, D. Hormesis : Factor Fiction ? *J. Nucl. Med.* **36**, 13–17 (1995).
379. Little, M. P., Wakeford, D. R., Tawn, E. J., Bouffler, S. D. & Berrington De Gonzalez, A. Risks Associated with Low Doses and Low Dose Rates of Ionizing Radiation: Why Linearity May Be (Almost) the Best We Can Do 1 Evidence for Departures from Linear or Linear-Quadratic Curvature in the Dose Response in Moderate-Dose Exposed Cohorts. **251**, (2009).
380. Sies, H. & Feinendegen, L. Radiation Hormesis: The Link to Nanomolar Hydrogen Peroxide. *Antioxid Redox Signal* **27**(9):596-598 (2017).
381. Lambin, P., Marples, B., Fertil, B., Malaise, E. & Joiner, M. Hyper-sensitivity of a human tumour cell line to very low radiation doses. *Int. J. Radiat. Biol.* **63**(5):639-650 (1993).
382. Marples, B. & Joiner, M. The response of Chinese hamster V79 cells to low radiation doses: evidence of enhanced sensitivity of the whole cell population. *Radiat. Res.* **133**(1):41–51 (1993).
383. Joiner, M., Marples, B., Lambin, P., Short, S. & Turesson, I. Low- dose hypersensitivity: current status and possible mechanisms. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **49**(2):379-389 (2001).
384. Joiner, M., Marples, B., Lambin, P., Short, S. & Turesson, I. Low-dose hypersensitivity: Current status and possible mechanisms. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **49**:379-389 (2001).
385. Marples, B., Wouters, B., Collis, S., Chalmers, A. & MC, J. Low-dose hyper-radiosensitivity: A consequence of ineffective cell cycle arrest of radiation-damaged g2-phase cells. *Radiat. Res.* **161**:247-255 (2004).
386. Vaganay-Juery, S. *et al.* Decreased DNA-pk activity in human cancer cells exhibiting hypersensitivity to low-dose irradiation. *Br. J. Cancer* **83**:514-518 (2000).
387. Short, S., Woodcock, M., Marples, B. & Joiner, M. Effects of cell cycle phase on low-dose hyper-radiosensitivity. *Int. J. Radiat. Biol.* **79**:99-105 (2003).
388. Xue, L. *et al.* ATM- dependent hyper-radiosensitivity in mammalian cells irradiated by



- heavy ions. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 75(1):235-243 (2009).
389. Tubiana, M. Dose-effect relationship and estimation of the carcinogenic effects of low doses of ionizing radiation: the joint report of the Academie des Sciences (Paris) and of the Academie Nationale de Medecine. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 63(2): 317-319 (2005).
  390. Thomas, C. *et al.* Impact of dose-rate on the low-dose hyper-radiosensitivity and induced radioresistance (HRS/IRR) response. *Int. J. Radiat. Biol.* 89(10):813-822 (2013).
  391. Słonina, D. *et al.* Low-Dose Hypersensitive Response for Residual pATM and  $\gamma$ H2AX Foci in Normal Fibroblasts of Cancer Patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **100**, 756–766 (2018).
  392. Marples, B. & Joiner, M. The elimination of low-dose hypersensitivity in Chinese hamster V79-379A cells by pretreatment with X rays or hydrogen peroxide. *Radiat. Res.* 141(2):160-169 (1995).
  393. Hall, J. *et al.* Ionizing radiation biomarkers in epidemiological studies – An update. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* **771**, 59–84 (2017).
  394. Elgart, S. R. *et al.* Investigation of DNA Damage Dose-Response Kinetics after Ionizing Radiation Schemes Similar to CT Protocols. *Radiat. Res.* **183**, 701–707 (2015).
  395. Fukumoto, W. *et al.* DNA damage in lymphocytes induced by cardiac CT and comparison with physical exposure parameters. *Eur. Radiol.* **27**, 1660–1666 (2017).
  396. Gomolka, M. *et al.* Age-dependent differences in DNA damage after in vitro CT exposure. *Int. J. Radiat. Biol.* **94**, 272–281 (2018).
  397. Popp, H. D. *et al.* Leukocyte DNA damage after reduced and conventional absorbed radiation doses using 3rd generation dual-source CT technology. *Eur. J. Radiol. Open* **3**, 134–137 (2016).
  398. Khan, K. *et al.* Flow cytometric detection of gamma-H2AX to evaluate DNA damage by low dose diagnostic irradiation. *Med. Hypotheses* **115**, 22–28 (2018).
  399. Kuefner, M. A. *et al.* Effect of CT scan protocols on x-ray-induced DNA double-strand breaks in blood lymphocytes of patients undergoing coronary CT angiography. *Eur. Radiol.* **20**, 2917–2924 (2010).
  400. Kuefner, M. A. *et al.* Reduction of X-ray induced DNA double-strand breaks in blood lymphocytes during coronary CT angiography using high-pitch spiral data acquisition with prospective ECG-triggering. *Invest. Radiol.* **45**, 182–187 (2010).
  401. Rothkamm, K., Balroop, S., Shekhdar, J., Fernie, P. & Goh, V. Leukocyte DNA Damage after Multi-Detector Row CT: A Quantitative Biomarker of Low-Level Radiation Exposure. *Radiology* **242**, 244–251 (2007).
  402. Vandevoorde, C. *et al.*  $\gamma$ -H2AX foci as in vivo effect biomarker in children emphasize the importance to minimize x-ray doses in paediatric CT imaging. *Eur. Radiol.* **25**, 800–811 (2014).
  403. Tao, S. M. *et al.* Comparison of the effect of radiation exposure from dual-energy CT versus single-energy CT on double-strand breaks at CT pulmonary angiography. *Eur. J. Radiol.* **101**, 92–96 (2018).
  404. Brand, M., Wuest, W., May, M., Uder, M. & Sommer, M. Influence of risk-organ-based tube current modulation on CT-induced DNA double-strand breaks in a biological phantom model. *J. Radiat. Res.* **59**, 692–699 (2018).
  405. Brand, M. *et al.* X-ray induced DNA double-strand breaks in coronary CT angiography: Comparison of sequential, low-pitch helical and high-pitch helical data acquisition. *Eur. J. Radiol.* **81**, e357–e362 (2012).
  406. Lobrich, M. *et al.* In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after

- computed tomography examinations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 8984–8989 (2005).
407. Golfier, S. *et al.* Dicentric chromosomes and  $\gamma$ -H2AX foci formation in lymphocytes of human blood samples exposed to a CT scanner: A direct comparison of dose response relationships. *Radiat. Prot. Dosimetry* **134**, 55–61 (2009).
408. Beels, L. *et al.* Dose-length product of scanners correlates with DNA damage in patients undergoing contrast CT. *Eur. J. Radiol.* **81**, 1495–1499 (2012).
409. Halm, B. M. *et al.* Pilot study for the establishment of biomarkers for radiation damage after computed tomography in children. *Hawaii J Med Public Heal.* **74**, 112–119 (2015).
410. Geisel, D. *et al.* DNA double-strand breaks as potential indicators for the biological effects of ionising radiation exposure from cardiac CT and conventional coronary angiography: A randomised, controlled study. *Eur. Radiol.* **22**, 1641–1650 (2012).
411. Kuefner, M., Brand, M., Engert, C., Schwab, S. & Uder, M. Radiation Induced DNA Double-Strand Breaks in Radiology. *RöFo - Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der Bildgeb. Verfahren* **187**, 872–878 (2015).
412. Rothkamm, K. *et al.* DNA Damage Foci: Meaning and Significance. *Environ. Mol. Mutagen.* (2015).
413. Shi, L. & Tashiro, S. Estimation of the effects of medical diagnostic radiation exposure based on DNA damage. *J. Radiat. Res.* **59**, ii121–ii129 (2018).
414. Valdiglesias, V., Giunta, S., Fenech, M., Neri, M. & Bonassi, S.  $\gamma$ H2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* **753**, 24–40 (2013).
415. Bonassi, S. *et al.* Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: Results from a pooled cohort study of 22 358 subjects in 11 countries. *Carcinogenesis* **29**, 1178–1183 (2008).
416. Oestreicher, U. *et al.* Automated scoring of dicentric chromosomes differentiates increased radiation sensitivity of young children after low dose CT exposure in vitro. *Int. J. Radiat. Biol.* **94**, 1017–1026 (2018).
417. Stephan, G., Schneider, K., Panzer, W., Walsh, L. & Oestreicher, U. Enhanced yield of chromosome aberrations after CT examinations in paediatric patients. *Int. J. Radiat. Biol.* **83**, 281–287 (2007).
418. Kanagaraj, K. *et al.* Assessment of dose and DNA damages in individuals exposed to low dose and low dose rate ionizing radiations during computed tomography imaging. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **789–790**, 1–6 (2015).
419. Abe, Y. *et al.* Increase in dicentric chromosome formation after a single CT scan in adults. *Sci. Rep.* **5**, 1–9 (2015).
420. Abe, Y. *et al.* Analysis of chromosome translocation frequency after a single CT scan in adults. *J. Radiat. Res.* **57**, 220–226 (2016).
421. Khattab, M. *et al.* Frequencies of micronucleated reticulocytes, a dosimeter of DNA double-strand breaks, in infants receiving computed tomography or cardiac catheterization. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **820**, 8–18 (2017).
422. Viau, M. *et al.* 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. *Cancer/Radiothérapie* (2016). doi:10.1016/j.canrad.2015.05.035
423. Göggelmann, W. *et al.* Re-evaluation of the RBE of 29 kV x-rays (mammography x-rays) relative to 220 kV x-rays using neoplastic transformation of human CGL1-hybrid cells. *Radiat. Environ. Biophys.* **42**, 175–182 (2003).
424. Vandevoorde, C. *et al.* EPI-CT: In vitro assessment of the applicability of the  $\gamma$ -H2AX-foci assay as cellular biomarker for exposure in a multicentre study of children in diagnostic radiology. *Int. J. Radiat. Biol.* **91**, 653–663 (2015).

425. Bae, K. T. Intravenous contrast medium administration and scan timing at CT: Considerations and approaches. *Radiology* **256**, 32–61 (2010).
426. Haschek, E. & Lindenthal, O. Contribution to the practical use of photography according to Röntgen. *Wien Klin Wochenschr* **9**:63 (1896).
427. Destot, E. & Bérard, L. Société des sciences médicales de Lyon - Séance du 11 novembre 1896. *Lyon Médical* **88**:392 (1896).
428. Mould, R. A century of X-rays and radioactivity in medicine. Institute of Physics Publishing. *CRC Press, London* (1993).
429. Oriel, J. The scars of Venus: a history of venereology. *Springer Verlag, London* (1994).
430. Moran, M. Urolithiasis: a comprehensive history. *Springer, New York* (2014).
431. Beer, E. Uroselectan intravenous urography. *Ann Surg* **92**:761–765 (1930).
432. Singh, J. & Daftary, A. Iodinated contrast media and their adverse reactions. *J Nucl Med Technol* **36**:69–74 quiz 76–77 (2008).
433. Amato, E. *et al.* Can contrast media increase organ doses in ct examinations? a clinical study. *Am. J. Roentgenol.* **200**, 1288–1293 (2013).
434. Deinzer, C. K. W., Danova, D., Kleb, B., Klose, K. J. & Heverhagen, J. T. Influence of different iodinated contrast media on the induction of DNA double-strand breaks after in vitro X-ray irradiation. *Contrast Media Mol. Imaging* **9**, 259–267 (2014).
435. Jost, G. *et al.* The influence of x-ray contrast agents in computed tomography on the induction of dicentric and  $\gamma$ -H2AX foci in lymphocytes of human blood samples. *Phys. Med. Biol.* **54**, 6029–6039 (2009).
436. Grudzenski, S. *et al.* Contrast Medium– enhanced Radiation Damage Caused by CT Examinations. *Radiology* **253**, 706–714 (2009).
437. Tao, S. M. *et al.* The effect of abdominal contrast-enhanced CT on DNA double-strand breaks in peripheral blood lymphocytes: an in vitro and in vivo study. *Acta radiol.* **60**, 687–693 (2019).
438. Wang, L. *et al.* Enhanced radiation damage caused by iodinated contrast agents during CT examination. *Eur. J. Radiol.* **92**, 72–77 (2017).
439. Pathe, C. *et al.* The presence of iodinated contrast agents amplifies DNA radiation damage in computed tomography. *Contrast Media Mol. Imaging* **6**, 507–513 (2011).
440. Piechowiak, E. I., Peter, J.-F. W., Kleb, B., Klose, K. J. & Heverhagen, J. T. Intravenous Iodinated Contrast Agents Amplify DNA Radiation Damage at CT. *Radiology* **000**, 132478 (2015).
441. Joubert, A. *et al.* Irradiation in presence of iodinated contrast agent results in radiosensitization of endothelial cells: Consequences for computed tomography therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **62**:1486–1496 (2005).
442. Segal, A. & Bush, W. J. Avoidable errors in dealing with anaphylactoid reactions to iodinated contrast media. *Invest. Radiol.* **46**:147–151 (2011).
443. Xue, L. *et al.* ATM-Dependent Hyper-Radiosensitivity in Mammalian Cells Irradiated by Heavy Ions. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **75**, 235–243 (2009).
444. Viau, M. *et al.* [repeated radiation dose effect and DNA repair: Importance of the individual factor and the time interval between the doses]. *Cancer Radiother.* **20**:217–25 (2016).
445. Ferlazzo, M. L. *et al.* DNA breaks induced by iodine-containing contrast medium in radiodiagnostics : a problem of tungsten ? *Eur. Radiol. Exp.* **15**, 2:21 (2018).
446. Riley, P. COMMENTARY Does iodinated contrast medium amplify DNA damage during exposure to radiation. *Br. Inst. Radiol.* (2015).
447. Sohier, T. Nouvelle approche de la dosimétrie des rayonnements ionisants par mesure de fluorescence, selon la technique du comptage de photon unique, corrélé en temps, à l'échelle nanoseconde. *Thèse Dr. Univ. Strasbg.*

448. Munier, M. Nouvelles molécules organiques scintillantes à base de liquides ioniques pour la détection et la discrimination de rayonnements nucléaires. *Thèse Dr. Univ. Strasbg.* (2011).
449. Munier, M., Sohier, T., Jung, J., Torres, M. & Barillon, R. Method for determining the irradiation dose deposited in a scintillator by ionising radiation and associated device. *WO2013060745(A1)*, date priorité 24/10/2011, *Publ. Int.* 02.05.2013 ; *US9244178(B2)*, délivrance 26.01.2016
450. Munier, M., Sohier, T., Jung, J., Torres, M. & Barillon, R. Procédé de détermination de la dose d'irradiation déposée dans un scintillateur par un rayonnement ionisant et dispositif associé. *FR2981757(B1)* ; date priorité 24/10/2011; délivrance 04.04.2014 *Bull.* 14/14
451. Lessard, F. *et al.* Validating plastic scintillation detectors for photon dosimetry in the radiologic energy range. *Med. Phys.* **39**, (2012).
452. Yoo, W. J. *ae et al.* Measurement of Entrance Surface Dose on an Anthropomorphic Thorax Phantom Using a Miniature Fiber-Optic Dosimeter. *Sensors (Basel)*. (2014). doi:10.3390/s140406305
453. Société Française de Physique Médicale. *Dosimétrie des explorations diagnostiques en radiologie RAPPORT S.F.P.M. N° 30.* (2014).
454. Centre de référence labellisé NEUROFIBROMATOSES. Protocole National de Diagnostic et de soins (PNDS) Neurofibromatose 1. *texte du PNDS* (2016).
455. Heymann, S. *et al.* Radio-induced malignancies after breast cancer postoperative radiotherapy in patients with Li-Fraumeni syndrome. *Radiat. Oncol.* **5**, 104 (2010).
456. Jin, L. *et al.* Characterization of primary human mammary epithelial cells isolated and propagated by conditional reprogrammed cell culture. *Oncotarget* **9**, 11503–11514 (2018).
457. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752 (2000).
458. Ferlazzo, M. L. *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.* **49**, (2014).
459. Massey, F. The Kolmogorov-Smirnov Test for Goodness of Fit. *J. Am. Stat. Assoc.* **46(253)**, 68–78 (1951).
460. Mann, H. & Whitney, D. On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *Ann Math Stat.* **18(1)**, 50–60 (1947).
461. Wilcoxon, F. Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biometrics Bull.* **1(6)**, 80–3 (1945).
462. Kruskal, W. & Wallis, W. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *J. Am. Stat. Assoc.* **47(260)**, 583–621 (1952).
463. A *et al.* ICRP Publication 103. *Ann. ICRP* **12**, 81–87 (2007).
464. Devic, C. *et al.* Influence of individual radiosensitivity in radiodiagnosis: Biological response to head CT scan exposures. *Submitted* (2020).
465. Devic, C. *et al.* Influence of individual radiosensitivity in radiodiagnosis: Biological response to chest CT scan exposures. *submitted* (2020).
466. 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.* **92(3)**:117-131 (2016).
467. Schieber, M. & Chandel, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.* **24**, R453–R462 (2014).
468. Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M. & Lunec, J. Oxidative DNA damage:

- Mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* **17**, 1195–1214 (2003).
469. Foray, N. *et al.* A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *EMBO J.* **22**, 2860–2871 (2003).
470. Pierce, D. A. & Preston, D. L. Radiation-Related Cancer Risks at Low Doses among Atomic Bomb Survivors. *Radiat. Res.* **154**, 178–186 (2000).
471. Grant, E. J. *et al.* Solid Cancer Incidence among the Life Span Study of Atomic Bomb Survivors: 1958–2009. *Radiat. Res.* **187**, 513–537 (2017).
472. Gillies, M., Haylock, R., Hunter, N. & Zhang, W. Risk of Leukemia Associated with Protracted Low-Dose Radiation Exposure: Updated Results from the National Registry for Radiation Workers Study. *Radiat. Res.* 192(5):527-537 (2019).
473. Preston, D. L. *et al.* Solid Cancer Incidence in Atomic Bomb Survivors: 1958–1998. *Radiat. Res.* **168**, 1–64 (2007).
474. Devic, C. *et al.* Le phénomène d’hypersensibilité aux faibles doses : Une énigme de la radiobiologie enfin résolue ? *Rev. médecine nucléaire* (2016).
475. Sulieman, A. *et al.* Dose reduction in chest CT examination. *Radiat. Prot. Dosimetry* **165**, 185–189 (2015).
476. Colin, C. *et al.* MRE11 and H2AX biomarkers in the response to low-dose exposure: Balance between individual susceptibility to radiosensitivity and to genomic instability. *Int. J. Low Radiat.* **8**, (2011).
477. Mothersill, C., Rusin, A., Fernandez-Palomo, C. & Seymour, C. History of bystander effects research 1905-present; what is in a name? *Int. J. Radiat. Biol.* **94**, 696–707 (2018).
478. Pereira, S. *et al.* Low doses of gamma-irradiation induce an early bystander effect in zebrafish cells which is sufficient to radioprotect cells. *PLoS One* **9**, (2014).
479. Colin, C. *et al.* Mre11 and h2ax biomarkers in the response to low-dose exposure: Balance between individual susceptibility to radiosensitivity and to genomic instability. *Int. J. Low Radiat.* 8:96-106 (2011).
480. Slonina, D., Biesaga, B., Urbanski, K. & Kojs, Z. Comparison of chromosomal radiosensitivity of normal cells with and without hrs-like response and normal tissue reactions in patients with cervix cancer. *Int. J. Radiat. Biol.* 84:421-428 (2008).
481. Thomas, C., Fertil, B. & Foray, N. Hyperradiosensibilité aux très faibles doses: impact en radiothérapie des micrométastases. *Cancer/Radiothérapie* **11**, 260–265 (2007).
482. Marples, B., Lambin, P., Skov, K. A. & Joiner, M. G. Low dose hyper-radiosensitivity and increased radioresistance in mammalian cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **71**, 721–735 (1997).
483. Tubiana, M. Dose-effect relationship and estimation of the carcinogenic effects of low doses of ionizing radiation: The joint report of the Académie des Sciences (Paris) and of the Académie Nationale de Médecine. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **63**, 317–319 (2005).
484. Jänicke, R. U., Sohn, D. & Schulze-Osthoff, K. The dark side of a tumor suppressor: Anti-apoptotic p53. *Cell Death Differ.* **15**, 959–976 (2008).
485. Joiner, M. C., Marples, B., Lambin, P., Short, S. C. & Turesson, I. Low-dose hypersensitivity: Current status and possible mechanisms. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **49**, 379–389 (2001).
486. Berthel, E., Foray, N. & Ferlazzo, M. L. The Nucleoshuttling of the ATM Protein: A Unified Model to Describe the Individual Response to High- and Low-Dose of Radiation? *Cancers (Basel)*. **11**, 905 (2019).
487. Joubert, A. *et al.* Irradiation in presence of iodinated contrast agent results in radiosensitization of endothelial cells: Consequences for computed tomography therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **62**, 1486–1496 (2005).

## 9 Annexes

### 9.1 Ruptures de l'ADN induites par les produits de contraste en radiodiagnostic : un problème de tungstène ?

Ferlazzo et al. *European Radiology Experimental* (2018) 2:21  
<https://doi.org/10.1186/s41747-018-0050-9>

European Radiology  
Experimental

#### HYPOTHESIS

#### Open Access

# DNA breaks induced by iodine-containing contrast medium in radiodiagnostics: a problem of tungsten?



Mélanie L. Ferlazzo<sup>1</sup>, Clement Devic<sup>1</sup>, Adeline Granzotto<sup>1</sup>, Anne-Marie Charvet<sup>2</sup>, Franck Pilleul<sup>3</sup>, Catherine Colin<sup>1,4</sup>, Marie-Claude Biston<sup>3</sup>, Aurélie Joubert<sup>5</sup>, Michel Bourguignon<sup>5</sup> and Nicolas Foray<sup>1\*</sup>

#### Abstract

Iodine-containing contrast media (ICM) are extensively used to improve image quality and information content in x-ray-based examinations, particularly in computed tomography (CT). In parallel, there is increasing evidence that the use of ICM during CT sessions is associated with deoxyribonucleic acid (DNA) breaks that may influence the estimation of the risks linked to x-ray exposure. Why has iodine been preferred to any other heavy elements to enhance contrast in radiodiagnostics? How to understand such DNA breaks effect? We searched for the answers in the early times of x-ray medical use. It appeared that the maximal ratio between the relative iodine and water mass energy absorption coefficients is reached in the range of 40–60 keV, which defines the energy range in which the dose is preferentially absorbed by ICM. This range does not correspond to the K-edge of iodine but to that of tungsten, the major component of the x-ray tube anode of CT scanners. At such energy, radiolysis of the ICM produces sodium or potassium iodide that prevents a normal DNA breaks repair and influences the individual response to x-ray low-dose. Both contrast enhancement and DNA breaks effect may therefore be caused by tungsten of the anodes of x-ray tubes.

**Keywords:** Contrast media, DNA, Iodine, Radiation tolerance, Tomography, x-ray computed

#### Key points

- The historical development of ICM has followed an empirical approach.
- The contrast is defined by the ratio iodine/water mass energy absorption coefficients.
- This ratio does not reach its maximal value at the iodine K-edge.
- This ratio reaches its maximal value at the tungsten K-edge.
- Iodine-related contrast is mainly caused by tungsten of x-ray tubes anode.

#### Introduction

Iodine-containing contrast media<sup>1</sup> (ICM) are extensively used to improve image quality and information content in x-ray-based examinations, particularly in computed tomography (CT) [1, 2]. In parallel, there is increasing evidence that the use of ICM during irradiation is associated with the production of additional deoxyribonucleic acid (DNA) breaks (Additional file 1: Table S1). Hence, why has iodine been preferred to any other heavy elements to enhance contrast in radiodiagnostics? How to understand such excess of DNA breaks?

#### Iodine as a contrast agent for CT exams: an empirical approach

As a first step, we searched for the answers to these questions in the early times of x-ray medical use.

The principles of contrast enhancement were born with radiology. Even before the first explanation of the photoelectric effect by Einstein in 1905, a number of

\* Correspondence: [Nicolas.foray@inserm.fr](mailto:Nicolas.foray@inserm.fr)

<sup>1</sup>Inserm, UMR 1052, Radiobiology Group, Cancer Research Centre, Bâtiment Cheney A, 69008 Rue Laennec, Lyon, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

radiologists developed strange recipes to render radiopaque the organs to be studied. In Vienna, Austria in January 1896 (i.e. some weeks after the Roentgen's discovery), Eduard Haschek and Otto Theodor Lindenthal [3] injected a mixture made of lime, cinnabar (mercury) and petroleum oil in the amputated hand from the cadaver of an old woman and observed the vessels by radiography. This was considered to be the first angiogram. In Lyon, France, in November 1896, Étienne Destot and Léon Bérard applied solutions containing gold or bronze powder to visualise brain and thyroid vasculature [4]. Other metals such as barium, lead and bismuth were also used for the same purpose [5]. Hence, radiologists intuitively favoured the use of heavy elements as contrast media while iodine was never cited before the 1920s.

Discovered in 1811, iodine was proposed for the treatment of syphilis as a mixture of iodine and potassium iodide in 1831 by Jean Guillaume Auguste Lugol. However, it was William Wallace in Dublin who contributed the most to the development of iodine therapy against syphilis [6]. While the direct curative effect of iodine on syphilis is still debated, the extensive application of iodine therapy in the 1920s, combined with routine x-ray observations, led to the empirical conclusion that urine in the bladder becomes radiopaque in sodium iodide-treated patients; iodine was therefore considered a promising contrast medium [7]. However, sodium iodide was too toxic and was eliminated too slowly [7]. Composed of benzene rings incorporating iodine atoms, the first ICM were lipiodol [7] and uroselectan, which led to the first intravenous urograms [8]. Anaphylactic reactions were reported early and a fierce race to develop safer ICM began in the middle of the 1920s [9].

Hence, the use of iodine to enhance contrast during x-ray exams was not led by a documented and logical approach but rather by empirical observations. Interestingly, to date, the atomic properties of iodine are evoked a posteriori to better explain the choice of ICM in contrast-enhanced CT practice. Notably, it is argued that since the most frequent x-ray tubes used in CT deliver a polychromatic 100–140-kVp x-ray spectrum that includes energies of 30–40 keV, it can trigger photoactivation of iodine whose K edge is at 33.20 keV [1]. Such a statement does not stand up to a quantitative and rigorous analysis of physical data. Indeed, the typical x-ray spectrum for CT is composed of a pseudo-bell-shaped curve from 20 to 80, 100, or 120 keV with a maximum around 50 keV. However, at this energy, the relative x-ray emission intensity never exceeds 20%. The iodine K-edge of 33 keV x-rays representing about 10% of emitted x-rays cannot quantitatively explain the contrast enhancement observed with ICM (Fig. 1, Table 1).

### When iodine meets tungsten

In addition to the broad polychromatic x-ray spectrum evoked above, two major x-ray peaks are observed, both related to the element that composed x-ray tubes anodes: tungsten (Fig. 1). First chosen by Franz Hanaman and Alexander Just in 1904 for the incandescent lamp because of its high melting point and its ductility, tungsten was introduced in x-ray tube anode by Coolidge in 1906.<sup>2</sup> The tungsten  $K_{\alpha}$  and  $K_{\beta}$  energies are at 59.30 and 67.23 keV, respectively. While relative x-ray emission intensity at 67.23 keV is < 50%, it is maximal (100%) at 59.30 keV, i.e. ten times more than at 33 keV (Fig. 1, Table 1). This x-ray range around 60 keV made x-ray tubes with a tungsten anode particularly suitable for CT. For mammography, for which x-rays do not need to be more penetrating, the anode is generally made of molybdenum or rhodium and its two K-edge energies are at 17.5 and 19.6 keV, and 20.3 and 22.7 keV, respectively.

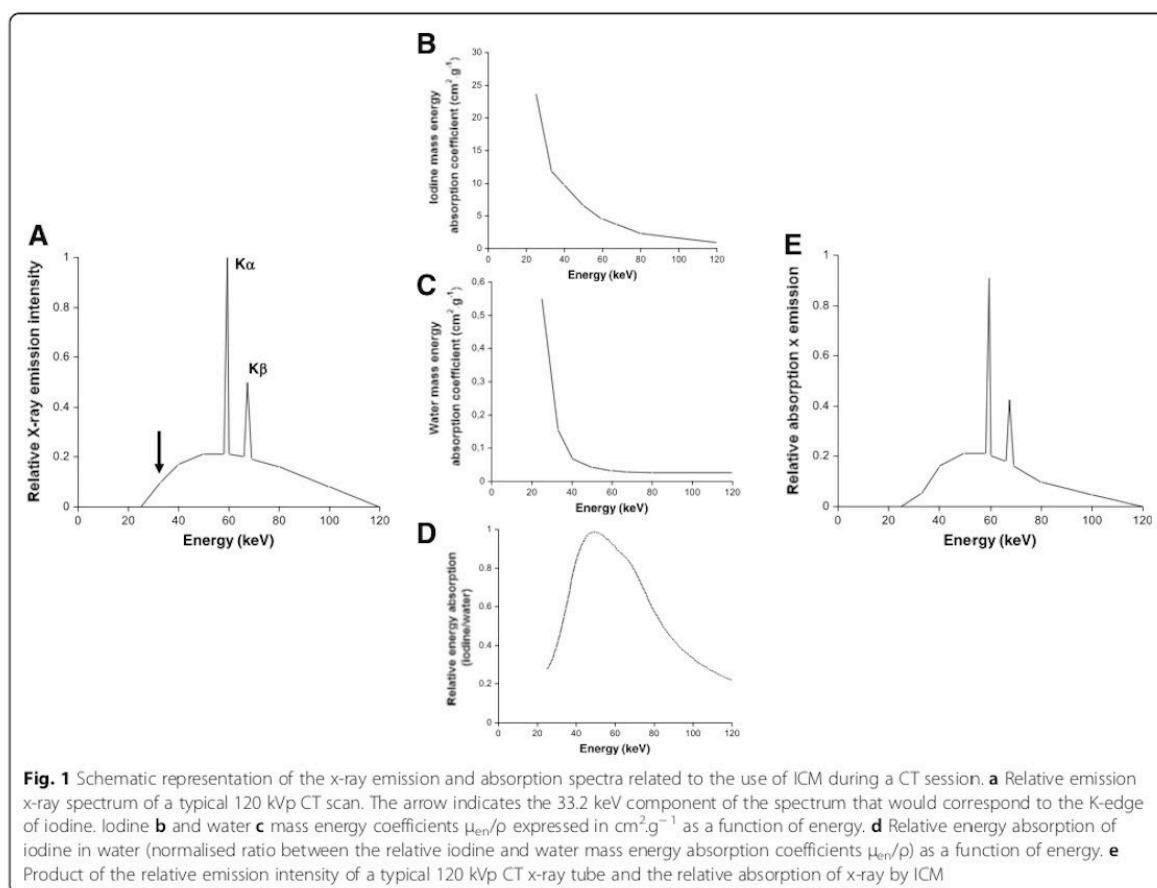
The conclusion that the most intensively emitted monochromatic energy of polychromatic x-ray CT tubes is 59.3 keV would have remained a simple detail if this energy did not also correspond to the maximal energy absorption of iodine atoms in water. In fact, with regard to contrast enhancement with ICM, two major points have to be considered: (1) the K-edge of iodine atoms at 33.20 keV corresponding to the maximal photoelectric effect; and (2) since ICM are injected in biological tissues, the energy absorption in water must be considered.

The maximal ratio between the relative iodine and water mass energy absorption coefficients  $\mu_{en}/\rho$  is reached in the range of 40–60 keV. Consequently, at 59.30 keV, the contrast obtained with ICM is maximal. Such a property is directly due to the composition of the x-ray tube anode in tungsten. Another element would drastically change the usefulness of ICM (Fig. 1, Table 1).

### The bad and good sides of a coincidence

The contrast phenomenon corresponds to a maximal energy local absorption, i.e. to a higher local dose in comparison to the dose absorbed in the absence of ICM. Hence, while this phenomenon is useful for the aim of diagnosis, such excess energy absorption may be responsible for specific molecular and cellular effects.

In 2005, it was shown that ICM could be photo-degraded (due to radiolysis) at CT scan energies and generate free  $I^{-}$  ions that rapidly associate with organic potassium or sodium to give sodium or potassium iodide [10]. In fact, unlike ICM molecules, iodides easily enter into the cell cytoplasm and nucleus, where they can interact with DNA. The dose-dependent production of iodides from ICM inhibits DNA double strand break (DSB) repair by decreasing the DNA-dependent protein kinase activity, an important signalling step required for a normal response to radiation. In parallel, such inhibition may favour error-prone DSB



repair pathways, which can increase genomic instability and cancer risk [10]. The observations that the presence of ICM during CT exams leads to DNA or chromosome breaks are not new and this radio-sensitisation effect was first observed in the 1970s with cytogenetics assays [11]

(Additional file 1: Table S1). Some authors also reported an excess of DSB in the lymphocytes of patients undergoing CT exams but a potential ICM-specific effect was not evoked [12–14]. The practical consequence of this excess of DSB (that corresponds to an excess of biological dose)

**Table 1** X-ray energy emission and absorption features for tungsten, iodine and water

Energy (keV)	Relative emission intensity of a typical 120-kV CT x-ray tube	Iodine mass energy absorption coefficient $\mu_{en}/\rho$	Water mass energy absorption coefficient $\mu_{en}/\rho$	$\mu_{en}/\rho$ (iodine) / $\mu_{en}/\rho$ (water)	Relative absorption (iodine in water)	Relative emission x absorption
20	0	23.63	0.55	42.96	0.28	0
33 (I K edge)	0.10	11.90	0.1557	76.429	0.49	0.049
40	0.18	9.62	0.06947	138.47	0.89	0.1602
50	0.21	6.57	0.04223	155.576	1	0.21
59.3 (W K $\alpha$ edge)	1	4.58	0.0328	139.634	0.91	0.91
60	0.21	4.52	0.0319	141.692	0.90	0.1911
67.23 (W K $\beta$ edge)	0.50	3.77	0.0285	132.28	0.85	0.425
80	0.17	2.33	0.02597	89.71	0.57	0.0969
120	0	0.91	0.0265	34.33	0.22	0

$\mu_{en}/\rho$  are expressed in  $\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$



suggests that the knowledge of the physical dose, whether assessed or calculated by standard methods, is not sufficient to better estimate the related risks when ICM are present during CT scan exams.

#### Influence of individual radiosensitivity

To date, there is an increasing evidence that unrepaired DSB are responsible for cell lethality and tissue radiosensitivity and that misrepaired DSB are linked to genomic instability and cancer proneness [15]. In the low-dose exposure of CT exams, tissue over-reactions are not expected and anaphylactic reactions observed in some patients shortly after ICM injections are not necessarily linked to unrepaired DSB [16]. Conversely, misrepaired DSB contributing to an increased cancer risk represent one major outcome of the ICM effect, even if there is still no consensus about specific misrepaired DSB markers. In addition, at the doses applied during CT exams, some specific effects, such as the low-dose hypersensitivity phenomenon, may lead to both excess of cell death and mutations [17, 18]. Thus, the contrast enhancement obtained by ICM may also strongly depend on individual radiosensitivity, which could explain the discrepancy between different authors about its quantitative contribution to the total dose (Additional file 1: Table S1).

#### Conclusion

While the use of ICM in radiodiagnostics was not based on a logical step-by-step approach, their efficiency to enhance contrast may lead to an excess of biological dose. The clinical consequences of such excess are likely to be dependent on the concentration of ICM and on the individual radiosensitivity. Further investigations that would take into account all these factors may be useful for a better estimation of the potential risk linked to contrast-enhanced CT exams.

#### Endnotes

<sup>1</sup>According to a recent semantic study [2], we preferred the term 'iodine-containing' to 'iodinated contrast agent', which has the advantage to keep the commonly accepted 'ICM' abbreviation.

<sup>2</sup>Until this date, the x-ray tube anode was made by cold metal and not by tungsten that reaches about 3000 °C when x-rays are emitted.

#### Additional file

**Additional file 1: Table S1.** Non-exhaustive list of reports investigating cell survival, chromosome and DNA damage in human cells exposed to radiation in presence of ICM. (DOCX 35 kb)

#### Abbreviations

CT: Computed tomography; DNA: Deoxyribonucleic acid; DSB: Double strand break; ICM: Iodine-containing contrast media

#### Availability of data and materials

Not applicable

#### Funding

The post-doctoral fellowship of MLF was supported by the Centre National d'Etudes Spatiales (CNES, Paris, France). This work was supported by the INDIRA project funded by the Commissariat General à l'Investissement (CGI, Paris, France).

#### Acknowledgments

Not applicable

#### Authors' contributions

All the authors directly participated to experiments that provide scientific bases of the design of this article. All authors read and approved the final manuscript.

#### Ethics approval and consent to participate

Not applicable

#### Consent for publication

Not applicable

#### Competing interests

The PhD thesis of CD was supported by Fibermetrix (Strasbourg, France) and Neolys Diagnostics (Lyon, France). The remaining authors declare no competing interests.

#### Publisher's Note

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

#### Author details

<sup>1</sup>Insem, UMR 1052, Radiobiology Group, Cancer Research Centre, Bâtiment Cheney A, 69008 Rue Laennec, Lyon, France. <sup>2</sup>Insem, UMR 836, European Synchrotron Radiation Facility, 38042 Grenoble, France. <sup>3</sup>Centre anti-cancer Léon-Bérard, 69008 Lyon, France. <sup>4</sup>Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalo-Universitaire Lyon Sud, 69495 Pierre-Bénite, France. <sup>5</sup>Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, 92260 Fontenay-aux-Roses, France.

Received: 21 January 2018 Accepted: 24 May 2018

Published online: 15 August 2018

#### References

- Bae KT (2010) Intravenous contrast medium administration and scan timing at CT: considerations and approaches. *Radiology* 256:32–61
- Nyman U, Aspelin P, Almen T (2015) Iodinated contrast media: a semantic somersault. *Radiology* 275:934
- Haschek E, Lindenthal O (1896) Contribution to the practical use of photography according to Röntgen. *Wien Klin Wochenschr* 9:63
- Destot E, Bérard L (1896) Société des sciences médicales de Lyon - Séance du 11 novembre 1896. *Lyon Médical* 88:392
- Mould RF (1993) A century of X-rays and radioactivity in medicine. Institute of Physics Publishing, CRC Press, London
- Oriel JD (1994) The scars of Venus: a history of venereology. Springer Verlag, London
- Moran ME (2014) Urolithiasis: a comprehensive history. Springer, New York
- Beer E (1930) Uroselectan intravenous urography. *Ann Surg* 92:761–765
- Singh J, Daftry A (2008) Iodinated contrast media and their adverse reactions. *J Nucl Med Technol* 36:69–74 quiz 76–77
- Joubert A, Biston MC, Boudou C et al (2005) Irradiation in presence of iodinated contrast agent results in radiosensitization of endothelial cells: consequences for computed tomography therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 62:1486–1496
- Norman A, Cochran ST, Sayre JW (2001) Meta-analysis of increases in micronuclei in peripheral blood lymphocytes after angiography or excretory urography. *Radiat Res* 155:740–743
- Lobrich M, Rief N, Kuhne M et al (2005) In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:8984–8989

13. Rothkamm K, Balroop S, Shekhdar J, Fernie P, Goh V (2007) Leukocyte DNA damage after multi-detector row CT: a quantitative biomarker of low-level radiation exposure. *Radiology* 242:244–251
14. Geisel D, Heverhagen JT, Kalinowski M, Wagner HJ (2008) DNA double-strand breaks after percutaneous transluminal angioplasty. *Radiology* 248: 852–859
15. Joubert A, Zimmerman KM, Bencokova Z et al (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* 84:1–19
16. Segal AJ, Bush WH Jr (2011) Avoidable errors in dealing with anaphylactoid reactions to iodinated contrast media. *Invest Radiol* 46:147–151
17. Xue L, Yu D, Furusawa Y, Cao J, Okayasu R, Fan S (2009) ATM-dependent hyper-radiosensitivity in mammalian cells irradiated by heavy ions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 75:235–243
18. Joiner MC, Marples B, Lambin P, Short SC, Turesson I (2001) Low-dose hypersensitivity: current status and possible mechanisms. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 49:379–389

Submit your manuscript to a SpringerOpen<sup>®</sup> journal and benefit from:

- Convenient online submission
- Rigorous peer review
- Open access: articles freely available online
- High visibility within the field
- Retaining the copyright to your article

---

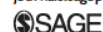
Submit your next manuscript at ► [springeropen.com](http://springeropen.com)

## 9.2 Influence de la radiosensibilité individuelle dans le phénomène de la réponse adaptative : Vers une explication mécanistique basée sur le transit de la protéine ATM ?

Review

# Influence of Individual Radiosensitivity on the Adaptive Response Phenomenon: Toward a Mechanistic Explanation Based on the Nucleo-Shuttling of ATM Protein

Dose-Response:  
An International Journal  
July-September 2018:1-11  
© The Author(s) 2018  
Article reuse guidelines:  
sagepub.com/journals-permissions  
DOI: 10.1177/1559325818789836  
journals.sagepub.com/home/dos



Clément Devic<sup>1,2</sup>, Mélanie L. Ferlazzo<sup>1</sup>, and Nicolas Foray<sup>1</sup>

### Abstract

The adaptive response (AR) phenomenon generally describes a protective effect caused by a “priming” low dose ( $d_{AR}$ ) delivered after a period of time ( $\Delta t_{AR}$ ) before a higher “challenging” dose ( $D_{AR}$ ). The AR is currently observed in human cells if  $d_{AR}$ ,  $\Delta t_{AR}$ , and  $D_{AR}$  belong to (0.001-0.5 Gy), (2-24 hours), (0.1-5 Gy), respectively. In order to investigate the molecular mechanisms specific to AR in human cells, we have systematically reviewed the experimental AR protocols, the cellular models, and the biological endpoints used from the 1980s. The AR appears to be preferentially observed in radiosensitive cells and is strongly dependent on individual radiosensitivity. To date, the model of the nucleo-shuttling of the ATM protein provides a relevant mechanistic explanation of the AR molecular and cellular events. Indeed, the priming dose  $d_{AR}$  may result in the diffusion of a significant amount of active ATM monomers in the nucleus. These ATM monomers, added to those induced directly by the challenging dose  $D_{AR}$ , may increase the efficiency of the response to  $D_{AR}$  by a better ATM-dependent DNA damage recognition. Such mechanistic model would also explain why AR is not observed in radioresistant or hyperradiosensitive cells. Further investigations at low dose are needed to consolidate our hypotheses.

### Keywords

adaptive response, radiosensitivity, radiation, ATM

### Introduction

A single dose of ionizing radiation (IR) triggers a cascade of physical, chemical, biological, and clinical events involving a large spectrum of spatiotemporal features (from femtoseconds to years; from femtometric to metric scale). Probably because the vaccination principles founded by Pasteur (note 1) were contemporary with the first descriptions of IR responses, the interpretation of the IR-induced phenomena was strongly influenced by immunology.<sup>1,2</sup> This is notably the case of the hypothesis that the deleterious consequences of a single IR dose may be attenuated by a priming “stimulus” of IR. One of the most remarkable illustrations of this hypothesis is the notion of “radiovaccination” that Claudius Regaud proposed by 1914: He was convinced that “dose fractionation beyond ten days of radiotherapy led to induced radioresistance of the tumor.”<sup>3</sup> However, the term “radiovaccination” was taken literally in a period that corresponded to a national campaign of vaccination against diphtheria and tuberculosis, and Regaud

never identified the inherent immunological mechanisms that might be responsible for such induced resistance.<sup>3,4</sup>

The “immunological” hypothesis was also at the origin of a plethora of papers in which 2 different terms have been used to describe and interpret data: “adaptive response” (AR) and “hormesis.”<sup>5-7</sup> Since the definition of these 2 terms have been so intricate through history, it is necessary here to define them in order to avoid any misinterpretation:

<sup>1</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Lyon, France

<sup>2</sup> Fibermatrix Company, Strasbourg, France

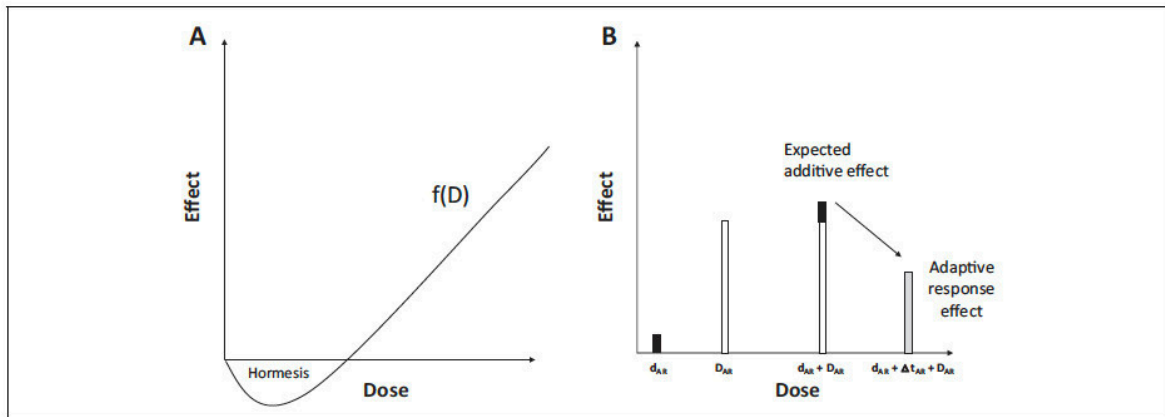
Received 11 January 2018; received revised 29 May 2018; accepted 12 June 2018

### Corresponding Author:

Nicolas Foray, Groupe de Radiobiologie, Bât Cheney A, INSERM UMR 1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France.  
Email: nicolas.foray@inserm.fr



Creative Commons Non Commercial CC BY-NC: This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 License (<http://www.creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits non-commercial use, reproduction and distribution of the work without further permission provided the original work is attributed as specified on the SAGE and Open Access pages (<https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage>).



**Figure 1.** Differences between hormesis and adaptive response phenomena. A, Hormesis is defined as a continuous function of dose with which a stimulatory (beneficial?) effect occurs at subinhibitory doses. Hormesis is a single dose or dose-rate effect (it can be observed during a chronic exposure to radiation). B, Adaptive response (AR) is defined as an infra-additive effect observed after the succession of a priming  $d_{AR}$  and a challenging dose  $D_{AR}$  separated by a period of time  $\Delta t_{AR}$  (the  $d_{AR} + \Delta t_{AR} + D_{AR}$  scenario).

*Adaptive response:* A wording analysis via Google Ngram viewer revealed that “AR” is a very old term widely used in the 19th century in evolutionary biology, physiology, and zoology to evoke a *long-term* adaptation of an organism or a species for some years or some generations (Supplemental Figure S1). Progressively, the notion of time necessary to adaptation disappeared and the following definition of AR is now proposed: AR is “a process of adaptation which allows survival *under adverse conditions*.”<sup>8</sup> With regard to the radiation research field, AR was first introduced in 1984 by Olivieri et al to describe a radiobiological phenomenon occurring after 2 successive doses<sup>9</sup>: the first one, the “priming” dose ( $d_{AR}$ ) precedes a certain period of time ( $\Delta t_{AR}$ ) and a higher “challenging” dose ( $D_{AR}$ ) under the following scheme:  $d_{AR} + \Delta t_{AR} + D_{AR}$  with  $D_{AR} > d_{AR}$ . The AR phenomenon occurs when the effect of  $d_{AR} + \Delta t_{AR} + D_{AR}$  is lower than that of  $D_{AR}$ .<sup>9</sup> The  $D_{AR}$  systematically produces hazardous effects or is lethal. The priming dose  $d_{AR}$  is generally interpreted as a stimulus of the cellular defenses to respond to the challenging dose  $D_{AR}$ .<sup>7,10</sup> However, the nature of such defenses is still unidentified (Figure 1).

*Hormesis:* The term “hormesis” was less frequently used than AR and was first introduced in 1943 (Supplemental Figure S1). When Southam and Ehrlich discovered that tree bark extracts stimulated fungi growing at low concentrations and was toxic at high concentrations, they proposed the term “hormesis” (from the ancient Greek, stimulus, rapid motion) to define “a stimulatory effect of subinhibitory concentrations of any toxic substance of any organism.”<sup>11</sup> With regard to the radiation field, such a term was first introduced in 1980 by T.D. Luckey to describe a J- or U-shaped dose-dependent phenomenon, implying that hormesis is described by a

*continuous function of dose (or dose rate)*, with a specific threshold dose that separates an IR dose range in which stress exposure is positive and another one in which stress is detrimental<sup>12,13</sup> (Figure 1). Strikingly, the notion of *stimulatory* effect was progressively replaced by the notion of *beneficial* effect, likely to be better opposed to the *toxic* effect observed at high doses. The nonlinear nature of the radiation hormesis phenomenon was an important aspect of the debate about the linear nonthreshold model.<sup>14,15</sup>

*Hormesis versus AR:* The abovementioned historical definition of “hormesis” may appear paradoxical, since hormesis means “stimulus,” which may suggest a first dose (the “stimulus”) that followed another one, similar to the abovementioned definition of AR. However, Southam and Ehrlich (1943) who first introduced this term used it to illustrate that doses belonging to a specific range may “stimulate” the cellular defenses. Furthermore, they did not apply a treatment consisting in repeated exposures to stress,<sup>11</sup> and the hormetic J- or U-shaped dose-response curves reported by Luckey in the literature did not refer to a succession of doses but to a single dose or dose rate.<sup>5,12</sup>

Hence, the abovementioned definitions, based on historical data and corresponding to specific experimental protocols, suggest that AR may lead to a reduction in risk linked to a high dose (“the adverse conditions”, the dose  $D_{AR}$ ) by another smaller one ( $d_{AR}$ ), while hormesis describes a dose range in which biological effects are beneficial *without induction of another exposure*. Hormesis and AR do not necessarily occur in the same dose range: As specified below,  $D_{AR}$  is generally equivalent to some Gy, while hormesis is observed with much lower doses ranging from mGy to cGy.<sup>5</sup> Since a reduction in the effect of some Gy is of interest in the radiodiagnosis and

radiotherapy field, we focused here on the understanding of the AR phenomenon. The mechanisms specific to hormesis will be the subject of another report.

To date, while the individual response to IR is a major societal and public health issue, AR seems to depend on individual radiosensitivity, in terms of both occurrence and extent.<sup>16,17</sup> In this review, in order to avoid any potential biases due to data obtained with other organisms, we have deliberately chosen to focus on the AR phenomenon observed in human cells in order to investigate the molecular and cellular mechanisms specific to AR. To this aim, we have systematically reviewed the experimental protocols, the cellular models and the biological endpoints. At the end of this review, we propose a mechanistic model explaining AR and its dependence vis-à-vis individual radiosensitivity.

### Adaptive Response Throughout History: A Plethora of Different Protocols

We identified 3 historical periods in the research about AR:

**1984 to 1989 period:** Historically, the first report of a radiation-induced AR phenomenon in human cells was published in 1984 by Olivieri et al.<sup>9</sup> The authors pre-incubated human lymphocytes with tritiated thymidine ( $0.1\text{-}0.01\ \mu\text{Ci}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) for 2 or 3 days and thereafter applied an X-ray dose of 1.5 Gy. In these conditions, the yield of chromatid aberrations was found to be lower than the sum of the yields of aberrations induced by tritiated thymidine and X-rays separately.<sup>9</sup> It must be stressed that, in these conditions, the priming dose was delivered at a low-dose rate. Between 1984 and 1989, the same research group published some variants of this protocol notably with single doses (eg,  $d_{\text{AR}} + \Delta t_{\text{AR}} + D_{\text{AR}}$ ) and the following ranges: (0.01-0.05 Gy) for  $d_{\text{AR}}$ , (16-32 hours) for  $\Delta t_{\text{AR}}$ , and (0.25-1.5 Gy) for  $D_{\text{AR}}$ .<sup>17-23</sup> Sanderson and Morley<sup>23</sup> and Sankaranarayanan et al<sup>24</sup> reached the same conclusions with a similar irradiation protocol but with mutations frequency as biological endpoint. In 1989, Bosi and Olivieri raised for the first time the question of the individual response to AR. With the same experimental protocol as the one used in 1984, AR was analyzed in lymphocytes from 18 donors: About 10% donors did not show AR and about 20% elicited a synergistic effect.<sup>17</sup> Hence, at the end of the 1980s, there was evidence that AR phenomenon depends on the individual status and occurs in human lymphocytes with chromatid aberrations or mutations frequency as endpoints, suggesting that AR may result in reducing genomic instability, cellular transformation and therefore cancer proneness.

**1990 to 1999 period:** In the 1990s, similar experimental protocols were applied but with larger  $d_{\text{AR}}$ ,  $\Delta t_{\text{AR}}$ , and  $D_{\text{AR}}$  ranges than those observed in the 1980s: (0.005-0.05 Gy) for  $d_{\text{AR}}$ , (1-48 hours) for  $\Delta t_{\text{AR}}$ , and (0.25-6

Gy) for  $D_{\text{AR}}$ .<sup>16,25-35</sup> Some new cellular models (eg, fibroblasts) and endpoints (eg, cell survival) were investigated. With regard to cell survival, Raaphorst and Boyden showed that AR strongly depends on the cell lines and also on  $\Delta t_{\text{AR}}$  (but with  $d_{\text{AR}}$  values between 0.5 and 2 Gy, ie, 10 times higher than the above range).<sup>16</sup> With human fibroblasts and tumor cell lines, Seong et al confirmed the influence of  $\Delta t_{\text{AR}}$  in the AR phenomenon: In their conditions, if  $\Delta t_{\text{AR}}$  was less than 1 hour or greater than 30 hours, AR did not occur.<sup>28</sup> Finally, this 1990 to 1999 period was particularly marked by an increasing number of reports investigating the individual response to AR. However, the genetic profile required for AR occurrence was not clearly defined.

**2000 to 2007 period:** From the 2000s, the considerable technological advances permitted to investigate AR-induced protein expression,<sup>36-38</sup> DNA methylation,<sup>39</sup> DNA damage repair and signaling assessed with various techniques,<sup>40-42</sup> and cell death pathways.<sup>36,43-45</sup> The  $d_{\text{AR}}$ ,  $\Delta t_{\text{AR}}$ , and  $D_{\text{AR}}$  ranges used in the reports published from 2000 were similar to those observed in the 1980s and the 1990s: (0.001-0.5 Gy) for  $d_{\text{AR}}$ , (2-24 hours) for  $\Delta t_{\text{AR}}$ , and (0.1-5 Gy) for  $D_{\text{AR}}$ .<sup>36-51</sup> All the endpoints tested in this period were linked to mis-repaired DNA damage, mutations frequencies, and cellular transformation or to unrepaired DNA damage and cellular death. Hence, during this period, AR appeared to reduce either the risk of radiation-induced cancer or the cellular radiosensitivity. Let us remind that these 2 notions are not necessarily linked: For example, for a given cell line, some authors observed a significant AR response with mutations frequencies but not with clonogenic survival.<sup>51</sup> It must also be stressed that some authors consider apoptosis as a protective and beneficial phenomenon as far as it could kill unstable cells specifically and reduce cancer risk.<sup>36</sup> Care must be taken with such a hypothesis, since apoptosis is a very specific cell death pathway, strongly dependent on the p53 status and cell type.<sup>52</sup> From the 2000s, the majority of AR reports investigated the individual response with an impressive variety of cell types: lymphocytes, lymphoblastoid cells, primary and transformed fibroblasts, keratinocytes, mammary epithelium, and tumor cells, suggesting that AR is not a phenomenon specific to a particular tissue (see the references cited above). Since all the AR-positive cellular models show various cell death pathways, apoptosis is not a specific feature of the AR phenomenon. To date, there is still no clear definition of individual, genetic, and cellular profile that would be required for an AR occurrence.

**Summary:** From the 1980s until to date, the AR response has been observed with the  $d_{\text{AR}} + \Delta t_{\text{AR}} + D_{\text{AR}}$  scenario and with the following values: (0.001-0.5 Gy) for  $d_{\text{AR}}$  delivered at dose-rate ranging, (1-48 hours) for

Table 1. Major Radiobiological Characteristics of the 3 Groups of Radiosensitivity as Defined in the study by Ryan et al.<sup>49</sup>

Radiosensitivity Group	Clinical Features	Examples	Cellular Surviving Fraction at 2 Gy (%)	ATM Nucleo-Shuttling Features	AR Occurrence
Group I	Radioresistance; Low cancer risk	—	60-80	Fast	Yes but with high $D_{AR}$
Group II	5%-20% incidence Moderate radiosensitivity (grade 1-4 tissue reactions) High cancer risk	BRCA1 <sup>+/-</sup> P53 <sup>+/-</sup> radiotherapy responders	10-60	Delayed	Yes
Group III	Very rare genetic syndromes (>1% incidence) Hyperradiosensitivity Grade 5 (fatal) reactions High cancer risk (lymphoma/leukemia) Severe immunodeficiency	ATM <sup>-/-</sup> LIG4 <sup>-/-</sup> radiotherapy overresponders	1-10	Either absent (ATM <sup>-/-</sup> ) or normal but with a gross DSB repair defect (eg, LIG4 <sup>-/-</sup> )	No

Abbreviations: AR, adaptive response; DSB, double-strand break.

$\Delta t_{AR}$ , and (0.1-6 Gy) for  $D_{AR}$ . To the notable exception of the works from the group of Olivieri who used tritiated thymidine, in the great majority (>83%) of reports,  $d_{AR}$  is delivered in less than 1 minute (ie, at dose rates ranging from 1 mGy.min<sup>-1</sup> to 1 Gy.min<sup>-1</sup>).  $D_{AR}$  is generally delivered in less than 5 minutes at about 1 Gy.min<sup>-1</sup>.

### The Influence of the $d_{AR}$ , $\Delta t_{AR}$ , and $D_{AR}$ Values on the AR Response

What is remarkable in the review of the AR protocols is that the single priming dose  $d_{AR}$  is, in more than 90% of reports, lower than 0.05 Gy but higher than 0.001 Gy. It is well documented that the oxidative stress caused by 1 Gy X- or  $\gamma$ -rays simultaneously induces about 10 000 base damage (BD), 1000 DNA single-strand breaks (SSB), and 40 DNA double-strand breaks (DSB) per human diploid cell. These DNA damage induction rates are not dependent on the radiosensitivity status of the cells.<sup>52</sup> Consequently, the priming doses  $d_{AR}$  generally induce less than 500 BD, 50 SSB, and 2 DSB per cell. These numbers correspond to a significant oxidative stress much lower than that induced by the spontaneous DNA damage background usually observed in human radioresistant cells.<sup>53</sup> Hence, such amounts of DNA damage cannot affect cell survival nor genomic instability significantly. By contrast, in radiosensitive cells, the oxidative stress due to spontaneous genomic instability causes a low but significant amount of DNA damage, larger than that observed in radioresistant cells.<sup>53</sup> Hence, only in radiosensitive cells, the spontaneous oxidative stress added to that caused by the priming dose  $d_{AR}$  may result in a significant amount of DNA damage: If a certain level of oxidative stress is

required for the AR occurrence, the AR phenomenon should preferentially occur in radiosensitive cells.

The average repair half-times of BD, SSB, and DSB are about 5 to 10 minutes, 10 to 20 minutes, and 50 to 60 minutes, respectively.<sup>52</sup> The review of the AR protocols reveals that  $\Delta t_{AR}$  is strongly dependent on the  $d_{AR}$  and  $D_{AR}$  values and generally greater than 1 hour but less than 24 hours. In radioresistant cells, 24 hour postirradiation corresponds to a complete repair of all the DNA damage induced by  $d_{AR}$ . By contrast, in radiosensitive cells, it is possible that some DSB may remain unrepaired or misrepaired after  $d_{AR} + \Delta t_{AR}$ . The DNA repair and signaling proteins may be therefore still activated during and after  $d_{AR} + \Delta t_{AR}$ . Hence, as hypothesized earlier and as the literature suggests AR should be much less frequent in radioresistant cells since  $d_{AR} + \Delta t_{AR}$  does not produce any significant biological effect before the exposure to  $D_{AR}$ .

In the great majority of cases,  $D_{AR}$  is higher than 0.5 Gy and frequently taken as 2 Gy, which corresponds to a high dose (a dose of 2 Gy per session is generally delivered in radiotherapy). A dose of 2 Gy generates a surviving fraction at 2 Gy (SF2) ranging between 1% to 10%, 10% to 60%, and 60% to 80% for the hyperradiosensitive, moderately radiosensitive, and radioresistant human cells, respectively (Table 1).<sup>53-55</sup> When reviewing the literature, AR was not observed in cells with SF2 lower than 10% and larger than 60%, which supports again that AR preferentially occurs in cells showing moderate radiosensitivity. This conclusion is also in agreement with the fact that radioresistance is a "bounded notion": Cells cannot repair more DNA damage when DNA repair is already complete and SF2 does not exceed 80% in human cells.<sup>53-55</sup> Conversely, if cells are hyperradiosensitive, the amount of cell death or mutations is so high (the effect of  $d_{AR} + \Delta t_{AR}$  is

already deleterious) that the biological consequences of an exposure to  $D_{AR}$  is irreversible. Finally, it is noteworthy that a condition added to the  $d_{AR} + \Delta t_{AR} + D_{AR}$  protocol to observe AR is that  $D_{AR}$  should be higher than  $d_{AR}$ . Indeed, there are very few examples, if any, of an occurrence of AR with  $D_{AR} < d_{AR}$  for 2 reasons, at least: (1)  $D_{AR}$  alone produces hazardous or even lethal effect. An additional dose would simply produce additive effect on cells; (2) the notion of *stimulus* at the basis of AR to reduce the effect of a hazardous dose would become irrelevant if  $D_{AR} < d_{AR}$ .

What are the biological or clinical relevance of the  $d_{AR}$ ,  $\Delta t_{AR}$ , and  $D_{AR}$  values? In fact, the  $d_{AR} + \Delta t_{AR} + D_{AR}$  scenario does not correspond to any current clinical, occupational, or environmental situation. One can however evoke a tumor positioning CT scan imaging (with a dose of the same order as  $d_{AR}$ ) followed by a radiotherapy session (with a dose of the same order as  $D_{AR}$ ). Nevertheless, even in this specific case, while AR may lead to decrease the radiosensitivity of healthy tissues, it would also decrease the radiosensitivity of the tumor, impacting therefore on the antitumor efficiency of the radiotherapy. Such scenario cannot be considered as a benefit for radiotherapy. It is noteworthy that most of reports about AR do not evoke the clinical relevance of the  $d_{AR} + \Delta t_{AR} + D_{AR}$  scenario.

### The Importance of the Cellular Model for the AR Occurrence and its Extent

From all the AR reports cited above, 2 remarks can be made:

- In the cases of circulating lymphocytes, all the donors are not necessarily AR positive and the ratio of AR positive/negative donors varies with the reports. No genetic explanation is provided.
- In all, the AR-positive human cells different from circulating lymphocytes listed from the 1980s, more than 50% are tumor cell lines, more than 30% are transformed or immortalized cells, and more than 75% are known to be radiosensitive.

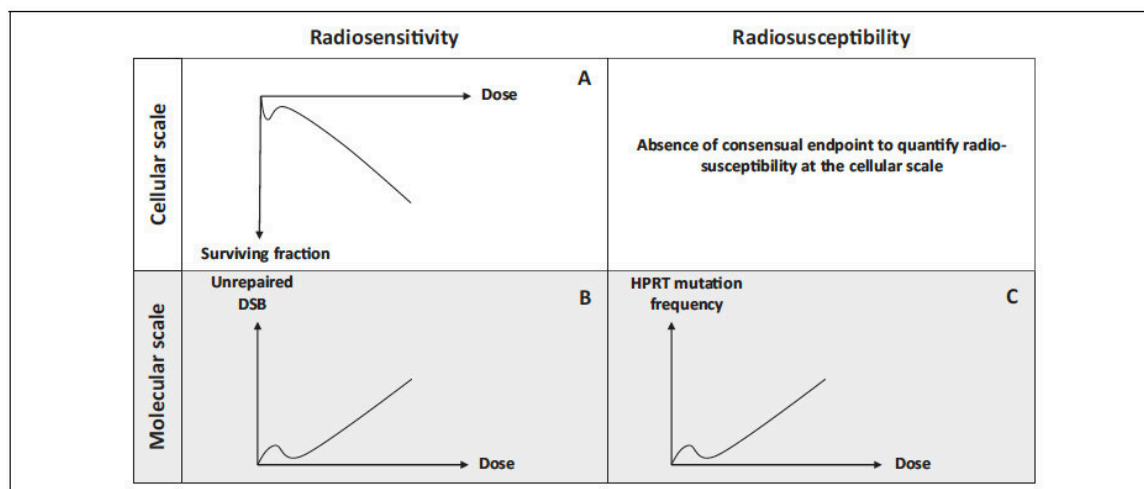
These remarks consolidate the abovementioned conclusion that the occurrence of AR is favored when cells elicit abnormally high level of genomic instability and/or radiosensitivity. For example, the reduction in the mutations frequency caused by AR is better measurable in a cellular model in which deleterious mutations are *already* present (like in immortalized or tumor cell lines).<sup>51</sup> In the case of human radioresistant primary fibroblasts showing AR, AR occurs when  $D_{AR}$  is equal to or greater than 4 Gy. At such dose, the micronuclei yield is measurable even in radioresistant cells.<sup>48</sup> However, if the level of genomic instability and/or radiosensitivity is too high, AR cannot alleviate irreversible damage. When cell survival was used as an endpoint, Raaphorst and Boyden showed that the hyper-radioresistant Sk-Mel-3 do not elicit AR.<sup>16</sup> Again, in the same report, the hyper-radioresistant HT144 tumor cell lines do not show AR since the effect of  $d_{AR} + \Delta t_{AR}$  is already deleterious.

Altogether, these examples suggest that AR preferentially occurs in cells showing an intermediate radiation response. The AR can however occur with radioresistant cases but with non-biologically relevant doses.<sup>48</sup>

### Individual Radiosensitivity and Its Potential Link With AR

Can one predict the AR occurrence and the AR extent from the radiosensitivity status? The term “radiosensitivity” was historically defined as the proneness to radiation-induced adverse tissue events (notably after radiotherapy) and related to noncancer effects attributable to cell death. However, the term “radiosensitivity” is still used also for describing the radiation-induced cellular transformation and cancer<sup>52</sup> (Figure 2). It must be stressed here that there is increasing evidence that the risk of radiation-induced tissue reactions and the risk of radiation-induced cancer are clearly different. For example, the Li-Fraumeni syndrome caused by heterozygous mutations of *p53* is associated with high cancer risk but not with severe postradiotherapy adverse tissue events. Conversely, homozygous ATM (note 2) mutations are associated with both fatal adverse tissue events after radiotherapy and high cancer risk (lymphomas). Hence, to avoid any confusion, we recently proposed to describe radiation-induced transformation and cancer by the term “radiosusceptibility”<sup>52</sup> (Figure 2).

What are the relationships between radiosensitivity and radiosusceptibility? Ataxia telangiectasia (AT) caused by homozygous mutations of the *ATM* gene is considered as the syndrome associated with the highest radiosensitivity observed in humans and characterized by fatal adverse tissue events after radiotherapy. The AT patients also had a very high risk of lymphomas. However, AT is a rare syndrome with an incidence of 1/100 000. There are other well-characterized syndromes associated with radiosensitivity. Some are characterized with high risk of cancer (eg, Nijmegen breakage syndrome) or with severe neurodegeneration and accelerated aging (eg, Hutchinson-Gilford progeroid syndrome), suggesting that radiosensitivity is not necessarily linked systematically to cancer proneness and radiosusceptibility.<sup>52</sup> Among the syndromes associated with both radiosensitivity and cancer proneness, the following rule is observed: The higher the incidence of syndromes, the less radiosensitive they are. For example, the *BRCA1* and *BRCA2* heterozygous mutations whose incidence is about 1/1000 lead to much less radiosensitivity than homozygous mutations of ATM whose incidence is 1/100 000. Conversely, these 3 cited mutations confer similar high risk of breast cancer, ovary cancer, and lymphoma, respectively.<sup>52</sup> Hence, unlike *BRCA1* and *BRCA2* cases, AR may not occur in AT cells if radiosensitivity is chosen as an endpoint, while AR may be measurable in AT, *BRCA1*, and *BRCA2* cells if mutations frequency (radiosusceptibility) is chosen as an endpoint. This last example illustrates the importance of the choice of both cellular models and endpoints in the study of AR.



**Figure 2.** Schematic illustration of the hypersensitivity to low dose (hyperradiosensitivity, HRS) through the difference between radiosensitivity and radiosusceptibility. Cell survival (A) or unrepaired double-strand break (DSB; B) are the most relevant endpoints to quantify radiosensitivity (risk of tissue reactions attributable to cell death). Yield of hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) mutations (C) is one of most relevant endpoints to quantify radiosusceptibility (risk of radiation-induced cancer). It is noteworthy that the endpoint that quantifies cell transformation is still not consensual.

### Links Between Hyperradiosensitivity to Low Doses and AR

First described by Lambin et al.<sup>56</sup> and Marples and Joiner,<sup>57</sup> the hyperradiosensitivity (HRS) to low-dose phenomenon results in a significant reduction in clonogenic cell survival, increase in chromosome breaks, micronuclei, and unrepaired DSB after a single low-dose  $d_{\text{HRS}}$  taken between 1 and 800 mGy.<sup>58</sup> The HRS phenomenon is not only observed with cell death and radiosensitivity-related endpoints but also concerns cellular transformation and genomic instability as well. Actually, HRS was observed when hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) mutations were taken as an endpoint through an excess of mutations between 1 and 500 mGy.<sup>59</sup> Hence, HRS cannot kill tumorigenic cells specifically, as it was hypothesized elsewhere,<sup>60</sup> and this phenomenon can produce excess of cellular transformation (radiosusceptibility) and/or excess of cell death (radiosensitivity)<sup>59</sup> (Figure 2). Besides, the maximal HRS response extent observed in human cells was reported to be limited to 25% cell survival: Even if HRS would kill specifically tumorigenic cells, its action would be limited to a minority of irradiated cells.<sup>61</sup>

The maximal HRS effect has been reported at a dose  $d_{\text{HRSmax}}$  taken between 0.1 and 0.8 Gy (the most frequent  $d_{\text{HRSmax}}$  is 0.2 Gy). The doses  $d_{\text{HRS}}$  are supposed to produce a biological effect equivalent to a dose 5 to 10 times higher.<sup>58,61</sup> More interestingly, similarly to AR, HRS has been generally observed in cells showing moderate radiosensitivity but neither in radioresistant nor in hyperradiosensitive cells.<sup>29,49,62</sup> Furthermore,  $d_{\text{HRS}}$  is of the same order as the  $d_{\text{AR}}$  ranges described earlier although slightly higher ( $d_{\text{AR}} \leq d_{\text{HRS}}$ ). Ryan et al reported that, among 7 human tumor cell lines, 4 were

found both AR- and HRS positive. Furthermore, in the same report, the 3 other cell lines were radioresistant and HRS negative but showed AR with high  $D_{\text{AR}}$  values, suggesting that cells can be AR positive without being necessarily HRS positive.<sup>49</sup> Altogether, the literature suggests that:

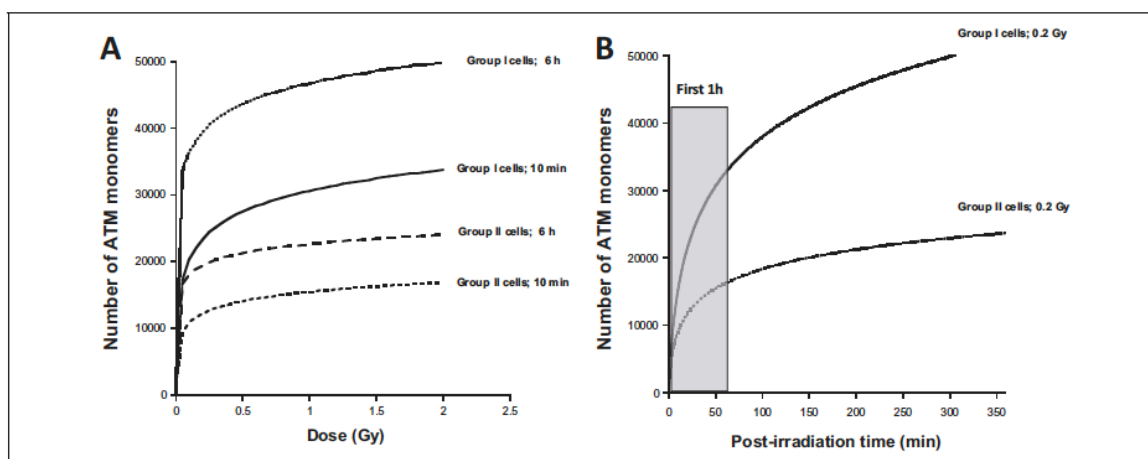
- Cells that are very radioresistant do not show HRS and AR.
- Cells that are hyperradiosensitive to high dose do not show HRS and AR.
- All the HRS positive cells are AR positive. By contrast, all the AR positive cells are not necessarily HRS positive.
- Both HRS and AR extents are maximal for the cells showing intermediate radiosensitivity.

How to explain these conclusions?

### The Theory of ATM Nucleo-Shuttling: A Mechanism Explaining Both AR and HRS?

To date, there is evidence that unrepaired DSBs are linked to cellular lethality, and misrepaired DSBs are linked to genomic instability and cellular transformation.<sup>52</sup> In 2016, we proposed a mechanistic model of HRS based on the theory of the ATM nucleo-shuttling.<sup>63</sup> The ATM protein kinase is a major protein involved in the molecular and cellular response to IR and particularly in the DSB signaling and repair pathways. In the frame of this theory, cytoplasm can be considered as a reservoir of ATM dimers composed of 2 trans-autophosphorylated ATM monomers. The IR-induced oxidative stress induces monomerization





**Figure 3.** Number of ATM monomers that diffuse into the nucleus for radioresistant group I and radiosensitive group II cells. Data plots represent the numerical simulation derived from the formula (1) validated in the study by Bodgi and Foray.<sup>63</sup> The following conditions were taken:  $S/L = 100 \cdot \pi \cdot 10^{-6}$  and  $\lambda_{mono} l_{mono} = 1.5$  for group I cells and 3.8 for group II cells as proposed in the study by Bodgi and Foray.<sup>63</sup> The Resulting formulas used here are:  $N_{i, diff}(t, D) = 11\,048 \ln(1 + 1.5 Dt)$  and  $N_{ii, diff}(t, D) = 4221 \ln(1 + 3.8 Dt)$  for group I and II cells, respectively. The A panel shows the simulated data as a function of the dose with the indicated repair times. The B panel shows the simulated data as a function of the repair time for a dose of 0.2 Gy. It is noteworthy that the first postirradiation hour is crucial for the hyperradiosensitivity (HRS) occurrence.

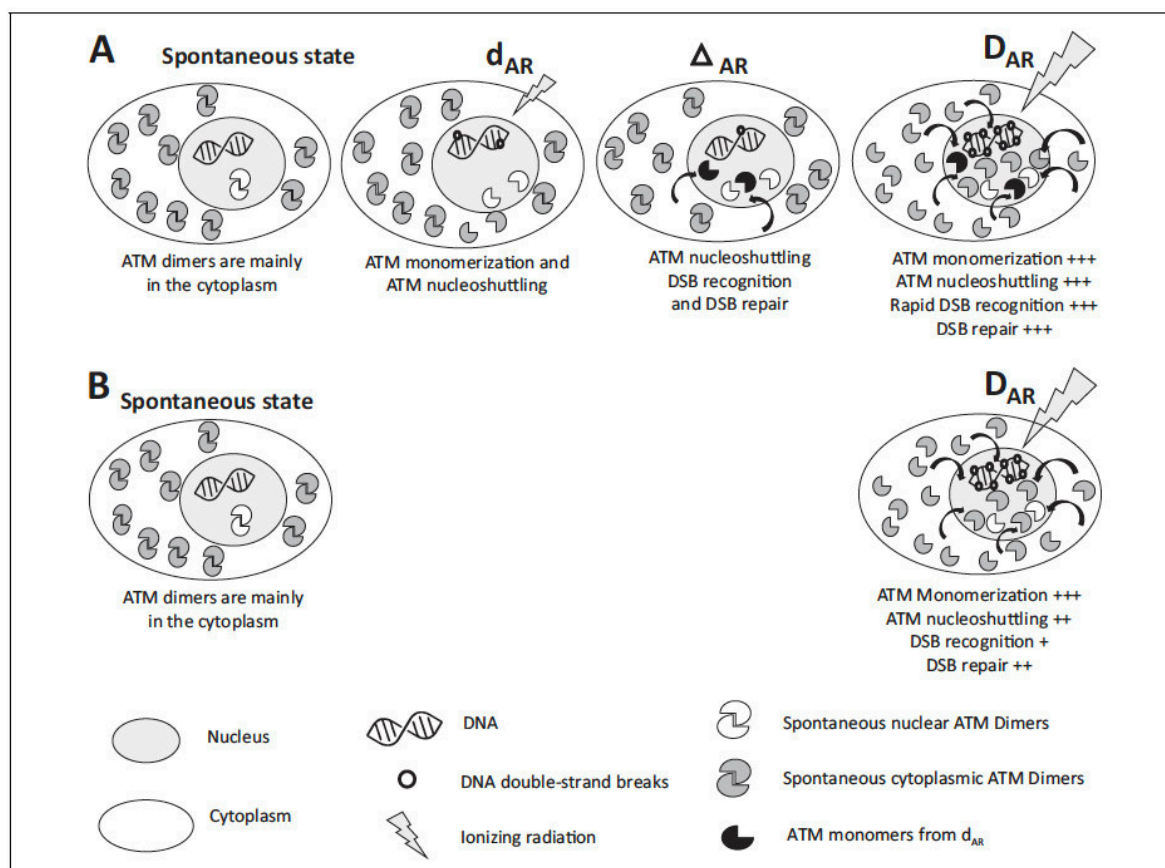
of ATM dimers: The resulting ATM monomers diffuse in the nucleus where they contribute to the DSB recognition through the phosphorylation of the H2AX histone ( $\gamma$ H2AX).<sup>63</sup> The  $\gamma$ H2AX phosphorylation triggers DSB repair via the nonhomologous end joining (NHEJ) pathway, the major DSB repair pathway in humans. The presence of ATM in the nucleus also inhibits the repair of DSB via the MRE11-dependent recombination-like error-prone pathway that leads to misrepaired DSB and cancer proneness.<sup>63</sup> From a collection of 117 cell lines showing a large spectrum of postradiotherapy adverse tissue reactions, any delay in the ATM nucleo-shuttling causes radiosensitivity (via nonrecognition or nonrepair of DSB via NHEJ) and/or radiosusceptibility (via the MRE11-dependent recombination-like error-prone pathway). A quantitative correlation was found between the maximal number of pATM foci assessed by immunofluorescence in the first hour postirradiation (pATMmax) and the severity of postradiotherapy tissue reaction (evaluated by common terminology criteria for adverse events (CTCAE) scale).<sup>53</sup> From the theory of the ATM nucleo-shuttling, a 3-group individual radiosensitivity classification was proposed:

- Group I: radioresistance and low cancer risk; fast ATM nucleo-shuttling; complete DSB repair,
- Group II: moderate radiosensitivity and high cancer risk; delayed ATM nucleo-shuttling; incomplete DSB repair,
- Group III: HRS and high cancer risk; gross DSB repair defect.

The theory of the ATM nucleo-shuttling also permitted to solve the linear-quadratic model by considering 2 types of lethal unrepaired DSB<sup>63</sup>:

- The  $\alpha$ -type DSBs are recognized by NHEJ pathway but remain unrepaired. If the dose is not high enough to induce a sufficient number of radiation-induced ATM monomers, DSBs will not be recognized. This situation likely concerns low doses. At high doses, the recognition rate is constant and dose-independent. It was shown that the number of  $\alpha$ -type DSB is simply proportional to  $D$ .<sup>63</sup>
- The  $\beta$ -type DSBs are not recognized by NHEJ pathway and therefore never repaired. These DSBs are not recognized because the ATM redimerization and the reassociation with cytoplasmic proteins prevent the ATM monomers to diffuse in the nucleus. This situation likely concerns high doses. It was shown that this effect increases proportionally with dose at the constant rate. Consequently, the number of  $\beta$ -type DSB is proportional to  $D$ .<sup>2,63</sup>

Interestingly, the theory of the ATM nucleo-shuttling was also shown to provide a relevant biological interpretation for the modified linear-quadratic model that describes the HRS phenomenon. In fact, at low doses, as specified earlier, the number of ATM monomers produced by IR in cytoplasm is reduced, more particularly in the radiosensitive group II cells, characterized by a significant delay in the ATM nucleo-shuttling. In this situation, few ATM monomers are able to diffuse in the nucleus. Consequently, less DSBs are recognized by NHEJ and will remain unrepaired. It was shown that if the radiation-induced DSBs are not recognized by NHEJ during the first hour postirradiation, they can also be recognized by the MRE11-dependent, error-prone recombination-like



**Figure 4.** General model for adaptive response (AR) based on the theory of the ATM nucleo-shuttling. The scenario  $d_{AR} + \Delta t_{AR}$  produces a significant excess of active ATM monomers in the nucleus before the exposure to  $D_{AR}$ . As a result, more double-strand break (DSB) are recognized by non-homologous end joining (NHEJ) after  $d_{AR} + \Delta t_{AR} + D_{AR}$  (panel A) than after  $D_{AR}$  (panel B): radiosensitivity and radiosusceptibility decrease. However, it is noteworthy that AR is preferentially observed in radiosensitive (group II) cells. The AR is not observed in radioresistant (group I) cells since the repair of DSB induced by  $d_{AR} + \Delta t_{AR}$  is complete. The AR is not observed in hyper-radiosensitive (group III) because the DNA damage caused by  $d_{AR} + \Delta t_{AR}$  are irreversible and their effect accumulates with that of  $D_{AR}$ . It is noteworthy that hyper-radiosensitivity (HRS) may occur after  $d_{AR}$  according to the number of ATM monomers diffusing in the nucleus during the first post-irradiation hour. The yield of spontaneous ATM monomers and dimers in the nucleus is likely to be much larger than their yield after exposure at  $d_{AR}$  or  $D_{AR}$ .

pathway.<sup>63</sup> Consequently, HRS can result in an excess of cell death due to unrepaired DSB or an excess of genomic instability due to misrepaired DSB, in agreement with the literature.<sup>63</sup> Furthermore, HRS is preferentially observed in the radiosensitive group II cells that are characterized by a delay in the ATM nucleo-shuttling. Hence, even if the number of IR-induced DSB is low at low dose, the number of unrepaired or misrepaired DSB and their biological impact is measurable.<sup>63</sup>

In the frame of the theory,  $N_{diff}$ , the number of ATM monomers that diffuse in the nucleus as a function of dose  $D$  and time postirradiation  $t$  obeys the following formula (1)<sup>63</sup>:

$$N_{diff}(t, D) = \frac{SP}{L \chi_{mono}} \ln(1 + \chi_{mono} I_{mono} D t), \quad (1)$$

in which the nuclear membrane is characterized by a width  $L$ , a nucleus surface  $S$ , a permeability  $P$  and in which  $\chi_{mono}$  is defined as the ATM monomers *reassociation* coefficient and  $I_{mono}$  the number of IR-induced ATM monomers per Gy. By taking the numerical values validated in Bodgi and Foray from hundreds of human fibroblasts with different radiosensitivity, the diffusion of ATM monomers as a function of dose for 10 minutes and 6 hours was simulated for 2 representative group I and II cell lines (Figure 3A). Interestingly, the diffusion of ATM monomers increases very rapidly with dose. In group II cells, after 10 minutes postirradiation, a dose of 0.1 Gy leads to the diffusion of about 10 000 ATM monomers in the nucleus while a dose of 2 Gy leads to the diffusion of only 15 000 ATM monomers (Figure 3A). When the number of ATM monomers

is observed as a function of time, more than 70% of ATM monomers are produced in the first hour postirradiation (Figure 3B). Because of the delay in ATM nucleo-shuttling, the radiosensitive group II cells show 2 times less ATM monomers in the nucleus than the radioresistant group I cells. For example, after 0.2 Gy (ie, average  $d_{AR}$ ) followed by 10 minutes, about 24 000 and 12 000 ATM monomers diffuse in the nucleus of group I and group II cells, respectively. The diffusion of ATM monomers continues with time and the numbers of ATM monomers in the nucleus become 40 000 and 20 000 at 6 hours postirradiation (ie, the average  $\Delta t_{AR}$ ) in the radioresistant group I and in the radiosensitive group II cells, respectively (Figure 3). Hence, after 0.2 Gy + 6 h, even if 80% of DSB are repaired (and therefore if 80% ATM monomers are inactivated by redimerization in the nucleus), the 20% remaining active monomers represent 8000 and 4000 ATM molecules in the nucleus of radioresistant group I and radiosensitive group II cells, respectively. A dose of 2 Gy (ie, average  $D_{RA}$ ) leads to the diffusion of about 30 000 and 16 000 additional ATM monomers in the nucleus after 10 minutes postirradiation, respectively (Figure 3). The 4000 ATM active monomers remaining in excess in the nucleus of the radiosensitive group II cells represent a supplement of about 25% (4000/16 000) ATM molecules that can significantly contribute to the DNA damage recognition with the ATM monomers induced directly by  $D_{RA}$  (Figure 4). Such an excess of ATM monomers may permit the AR phenomenon to occur. In the frame of this model, if  $\Delta t_{AR}$  is too short (less than 1 hour), the flux of ATM monomers may not be sufficient; if  $\Delta t_{AR}$  is too long (more than 24 hours), the activity of monomers may become negligible. Hence, in the group II radiosensitive cells,  $d_{AR} + \Delta t_{AR}$  can produce a stimulus for DNA damage repair through an excess of ATM monomers in agreement with the literature. Finally, since the occurrence of HRS mainly depends on the number of ATM monomers in the first postirradiation hour, it is not surprising that HRS-positive cells are also AR positive. The theory of ATM nucleo-shuttling is therefore compatible with both HRS and AR phenomena (Figure 4).

## Conclusions

The AR phenomenon is an experimentally validated phenomenon observed in a variety of cellular models and with numerous experimental protocols that all obey the  $d_{AR} + \Delta t_{AR} + D_{AR}$  irradiation scheme. It is not a technical artifact. It has been reported when radiosensitivity or radiosusceptibility are used as an endpoint. However, AR cannot be necessarily considered as beneficial since it may protect tumor or stimulate the transformation of healthy tissues. Furthermore, the AR occurrence strongly depends on the individual radiosensitivity/radiosusceptibility status: AR has been preferentially observed in cells from patients showing moderate radiosensitivity and high radiosusceptibility. Practically, to the notable exception of a tumor positioning CT scan that would precede a radiotherapy session after some hours, the  $d_{AR} + \Delta t_{AR} + D_{AR}$  irradiation scheme is not encountered in clinic: AR

phenomenon therefore remains a question relative to basic science. To date, the theory of the ATM nucleo-shuttling provides a relevant mechanistic explanation of the AR molecular and cellular events that reveals also the genetic status required for AR occurrence (Figure 4). The fact that the  $d_{AR} + \Delta t_{AR} + D_{AR}$  irradiation scheme may produce sufficient amount of ATM monomers in the nucleus to contribute to respond to the dose  $D_{AR}$  may evoke a kind of “vaccination”. However, the mechanistic model proposed here to explain the AR phenomenon is not related to the immune response to radiation. Further investigations of ATM nucleo-shuttling at low dose are needed to consolidate our model.

## Acknowledgments

The authors thank Christiane Beaufrère for her technical help. The PhD thesis of C.D. is supported by Fibermetrix and Neolys Diagnostics companies. The postdoctoral fellowship of M.L.F is supported by the Centre National d'Etudes Spatiales (CNES). This work was supported by the Commissariat Général à l'Investissement (Programmes Investissement d'avenir – INDIRA project).


## Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

## Funding

The author(s) received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

## ORCID iD

Nicolas Foray  <http://orcid.org/0000-0002-1282-1303>

## Supplemental Material

Supplemental material for this article is available online.

## Notes

1. Pasteur died only 3 months before the X-ray discovery in 1895.
2. The acronym ATM protein refers to Ataxia-telangiectasia mutated kinase as a key modulator in radiation-induced DNA damage repair.

## References

1. Foray N. Victor despeignes, the forgotten pioneer of radiation oncology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2016;96(4):717-721.
2. Foray N. 1896-2016: la radiothérapie a 120 ans ! ou comment une discipline médicale a pu réunir Roentgen, Pasteur et les Frères Lumières [in French]. *Cancer Radiother*. 2016;20:820-823.
3. Del Regato JA. Editorial: cell resistance incited by radiation. *Am J Cancer*. 1932;16(5):1246-1249.
4. Nogier T, Regaud C. Décroissance de la radiosensibilité des tumeurs malignes traitées par des doses successives et convenablement espacées des rayons X. Autoimmunisation contre les rayons [in French]. *C R Acad Sci III*. 1914;158(1):1711-1714.
5. Calabrese EJ, Baldwin LA. Radiation hormesis: its historical foundations as a biological hypothesis. *Human Exp Toxicol*. 2000;19(1):41-75.

6. Calabrese EJ. Hormesis: a fundamental concept in biology. *Microb Cell*. 2014;1(5):145-149.
7. Calabrese EJ, Bachmann KA, Bailer AJ, et al. Biological stress response terminology: integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007;222(1):122-128.
8. Schwab M. *Encyclopedia of Cancer*. Heidelberg, Germany: Springer; 2011.
9. Olivieri G, Bodycote J, Wolff S. Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science*. 1984;223(4636):594-597.
10. Joiner MC, Lambin P, Marples B. Adaptive response and induced resistance. *C R Acad Sci III*. 1999;322(2-3):167-175.
11. Southam CM, Ehrlich J. Effects of extract of western red-cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture. *Phytopathology*. 1943;33:517-524.
12. Luckey TD. *Hormesis With Ionizing radiation*. New York, NY: CRC Press; 1980.
13. Calabrese EJ. Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists. *Environ Toxicol Chem*. 2008;27(7):1451-1474.
14. Calabrese EJ. Model uncertainty via the integration of hormesis and LNT as the default in cancer risk assessment. *Dose Response*. 2015;13(4):1559325815621764.
15. Calabrese EJ, Shamoun DY, Hanekamp JC. The integration of LNT and hormesis for cancer risk assessment optimizes public health protection. *Health Phys*. 2016;110(3):256-259.
16. Raaphorst GP, Boyden S. Adaptive response and its variation in human normal and tumour cells. *Int J Radiat Biol*. 1999;75(7):865-873.
17. Bosi A, Olivieri G. Variability of the adaptive response to ionizing radiations in humans. *Mutat Res*. 1989;211(1):13-17.
18. Wolff S, Afzal V, Wiencke JK, Olivieri G, Michaeli A. Human lymphocytes exposed to low doses of ionizing radiations become refractory to high doses of radiation as well as to chemical mutagens that induce double-strand breaks in DNA. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*. 1988;53(1):39-47.
19. Wiencke JK, Afzal V, Olivieri G, Wolff S. Evidence that the [3H]thymidine-induced adaptive response of human lymphocytes to subsequent doses of X-rays involves the induction of a chromosomal repair mechanism. *Mutagenesis*. 1986;1(5):375-380.
20. Shadley JD, Afzal V, Wolff S. Characterization of the adaptive response to ionizing radiation induced by low doses of X rays to human lymphocytes. *Radiat Res*. 1987;111(3):511-517.
21. Shadley JD, Wiencke JK. Induction of the adaptive response by X-rays is dependent on radiation intensity. *Int J Radiat Biol*. 1989;56(1):107-118.
22. Shadley JD, Wolff S. Very low doses of X-rays can cause human lymphocytes to become less susceptible to ionizing radiation. *Mutagenesis*. 1987;2(2):95-96.
23. Sanderson BJS, Morley AA. Exposure of human lymphocytes to ionizing radiation reduces mutagenesis by subsequent ionizing radiation. *Mutat Res* 1986;164(6):347-351.
24. Sankaranarayanan K, von Duyn A, Loos MJ, Natarajan AT. Adaptive response of human lymphocytes to low-level radiation from radioisotopes or X-rays. *Mutat Res*. 1989;211(1):7-12.
25. Kelsey KT, Memisoglu A, Frenkel D, Liber HL. Human lymphocytes exposed to low doses of X-rays are less susceptible to radiation-induced mutagenesis. *Mutat Res*. 1991;263(4):197-201.
26. Shadley JD, Dai GQ. Cytogenetic and survival adaptive responses in G1 phase human lymphocytes. *Mutat Res*. 1992;265(2):273-281.
27. Rigaud O, Moustacchi E. Radioadaptation to the mutagenic effect of ionizing radiation in human lymphoblasts: molecular analysis of HPRT mutants. *Cancer Res*. 1994;54(7 suppl):1924s-1928s.
28. Seong J, Suh CO, Kim GE. Adaptive response to ionizing radiation induced by low doses of gamma rays in human cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1995;33(4):869-874.
29. Joiner MC, Lambin P, Malaise EP, et al. Hypersensitivity to very-low single radiation doses: its relationship to the adaptive response and induced radioresistance. *Mutat Res*. 1996;358(2):171-183.
30. Ueno AM, Vannais DB, Gustafson DL, Wong JC, Waldren CA. A low, adaptive dose of gamma-rays reduced the number and altered the spectrum of S1- mutants in human-hamster hybrid AL cells. *Mutat Res*. 1996;358(2):161-169.
31. Boothman DA, Meyers M, Odegaard E, Wang M. Altered G1 checkpoint control determines adaptive survival responses to ionizing radiation. *Mutat Res*. 1996;358(2):143-153.
32. Salone B, Grillo R, Aillaud M, Bosi A, Olivieri G. Effects of low-dose (2 cGy) X-ray on cell-cycle kinetics and on induced mitotic delay in human lymphocyte. *Mutat Res*. 1996;351(2):193-197.
33. Filippovich IV, Sorokina NI, Robillard N, Lisbona A, Chatal JF. Radiation-induced apoptosis in human tumor cell lines: adaptive response and split-dose effect. *Int J Cancer*. 1998;77(1):76-81.
34. Redpath JL, Antoniono RJ. Induction of an adaptive response against spontaneous neoplastic transformation in vitro by low-dose gamma radiation. *Radiat Res*. 1998;149(5):517-520.
35. Cregan SP, Brown DL, Mitchel RE. Apoptosis and the adaptive response in human lymphocytes. *Int J Radiat Biol*. 1999;75(9):1087-1094.
36. Chen Z, Sakai K. Enhancement of radiation-induced apoptosis by preirradiation with low-dose X-rays in human leukemia MOLT-4 cells. *J Radiat Res*. 2004;45(2):239-243.
37. Hauptmann M, Haghdoost S, Gomolka M, et al. Differential response and priming dose effect on the proteome of human fibroblast and stem cells induced by exposure to low doses of ionizing radiation. *Radiat Res*. 2016;185(3):299-312.
38. Zhao Y, Zhong R, Sun L, Jia J, Ma S, Liu X. Ionizing radiation-induced adaptive response in fibroblasts under both monolayer and 3-dimensional conditions. *PLoS One*. 2015;10(3):e0121289.
39. Ye S, Yuan D, Xie Y, Pan Y, Shao C. Role of DNA methylation in long-term low-dose gamma-rays induced adaptive response in human B lymphoblast cells. *Int J Radiat Biol*. 2013;89(11):898-906.
40. Gajendiran N, Tanaka K, Kumaravel TS, Kamada N. Neutron-induced adaptive response studied in go human lymphocytes using the comet assay. *J Radiat Res*. 2001;42(1):91-101.

41. Stoilov LM, Mullenders LH, Darroudi F, Natarajan AT. Adaptive response to DNA and chromosomal damage induced by X-rays in human blood lymphocytes. *Mutagenesis*. 2007;22(2):117-122.
42. Shelke S, Das B. Dose response and adaptive response of non-homologous end joining repair genes and proteins in resting human peripheral blood mononuclear cells exposed to gamma radiation. *Mutagenesis*. 2015;30(3):365-379.
43. Dieriks B, De Vos W, Baatout S, Van Oostveldt P. Repeated exposure of human fibroblasts to ionizing radiation reveals an adaptive response that is not mediated by interleukin-6 or TGF-beta. *Mutat Res*. 2011;715(1-2):19-24.
44. Toprani SM, Das B. Radio-adaptive response of base excision repair genes and proteins in human peripheral blood mononuclear cells exposed to gamma radiation. *Mutagenesis*. 2015;30(5):663-676.
45. Park HS, You GE, Yang KH, et al. Role of AKT and ERK pathways in controlling sensitivity to ionizing radiation and adaptive response induced by low-dose radiation in human immune cells. *Eur J Cell Biol*. 2015;94(12):653-660.
46. Pretazzoli V, Salone B, Bosi A, Olivieri G. Variability of G(2) checkpoint sensitivity to low doses of X-rays (2 cGy): correlation with G(2) chromatid aberrations but not with an adaptive response. *Mutagenesis*. 2000;15(6):531-535.
47. Mothersill C, Seymour CB, Joiner MC. Relationship between radiation-induced low-dose hypersensitivity and the bystander effect. *Radiat Res* 2002;157(5):526-532.
48. Broome EJ, Brown DL, Mitchel RE. Dose responses for adaption to low doses of (60)Co gamma rays and (3)H beta particles in normal human fibroblasts. *Radiat Res*. 2002;158(2):181-186.
49. Ryan LA, Seymour CB, Joiner MC, Mothersill CE. Radiation-induced adaptive response is not seen in cell lines showing a bystander effect but is seen in lines showing HRS/IRR response. *Int J Radiat Biol*. 2009;85(1):87-95.
50. Toprani SM, Das B. Role of base excision repair genes and proteins in gamma-irradiated resting human peripheral blood mononuclear cells. *Mutagenesis*. 2015;30(2):247-261.
51. Manesh SS, Sangsuwan T, Wojcik A, Haghdoust S. Studies of adaptive response and mutation induction in MCF-10A cells following exposure to chronic or acute ionizing radiation. *Mutat Res*. 2015;780:55-59.
52. Foray N, Bourguignon M, Hamada N. Individual response to ionizing radiation. *Mutat Res Rev*. 2016;770(pt B):369-386.
53. Granzotto A, Benadjaoud MA, Vogin G, et al. Influence of nucleoshuttling of the ATM protein in the healthy tissues response to radiation therapy: toward a molecular classification of human radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2016;94(3):450-460.
54. Joubert A, Zimmerman KM, 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(2):107-125.
55. Deschavanne PJ, Fertel B. A review of human cell radiosensitivity in vitro. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1996;34(1):251-266.
56. Lambin P, Marples B, Fertel B, Malaise EP, Joiner MC. Hypersensitivity of a human tumour cell line to very low radiation doses. *Int J Radiat Biol*. 1993;63(5):639-650.
57. Marples B, Joiner MC. The response of Chinese hamster V79 cells to low radiation doses: evidence of enhanced sensitivity of the whole cell population. *Radiat Res*. 1993;133(1):41-51.
58. Joiner MC, Marples B, Lambin P, Short SC, Turesson I. Low-dose hypersensitivity: current status and possible mechanisms. *Int J Radiat Biol Oncol Phys*. 2001;49(2):379-389.
59. Xue L, Yu D, Furusawa Y, Cao J, Okayasu R, Fan S. ATM-dependent hyper-radiosensitivity in mammalian cells irradiated by heavy ions. *Int J Radiat Biol Oncol Phys*. 2009;75(1):235-243.
60. Tubiana M. Dose-effect relationship and estimation of the carcinogenic effects of low doses of ionizing radiation: the joint report of the Academie des Sciences (Paris) and of the Academie Nationale de Medecine. *Int J Radiat Biol Oncol Phys*. 2005;63(2):317-319.
61. 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(10):813-822.
62. Marples B, Joiner MC. The elimination of low-dose hypersensitivity in Chinese hamster V79-379A cells by pretreatment with X rays or hydrogen peroxide. *Radiat Res*. 1995;141(2):160-169.
63. Bodgi L, Foray N. The nucleo-shuttling of the ATM protein as a basis for a novel theory of radiation response: resolution of the linear-quadratic model. *Int J Radiat Biol*. 2016;92(3):117-131.

### 9.3 Influence de la radiosensibilité individuelle dans le phénomène d'hormésis : Vers une explication mécanistique basée sur le transit de la protéine ATM ?

Dose Response



#### **Influence of individual radiosensitivity on the hormesis phenomenon: towards a mechanistic explanation based on the nucleo-shuttling of ATM protein**

Journal:	<i>Dose-Response</i>
Manuscript ID	19-146-DR.R2
Manuscript Type:	Review
Date Submitted by the Author:	02-Feb-2020
Complete List of Authors:	Devic, Clément; INSERM, UA8 Unit "Radiations : Defense, Health and Environment" Ferlazzo, Mélanie; INSERM, UA8 Unit "Radiations : Defense, Health and Environment" Berthel, Elise; INSERM , UA8 Unit "Radiations : Defense, Health and Environment" Foray, Nicolas; INSERM, UA8 Unit "Radiations : Defense, Health and Environment"
Keywords:	hormesis, adaptive response, radiosensitivity, radiation, ATM

SCHOLARONE™  
Manuscripts

**Influence of individual radiosensitivity on the hormesis phenomenon:  
towards a mechanistic explanation based on the nucleoshuttling of ATM  
protein**

**Clément Devic<sup>1,2</sup>, Mélanie L. Ferlazzo<sup>1</sup>, Elise Berthel<sup>1</sup> and Nicolas Foray<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UA8 Unit  
« Radiations : Defense, Health and Environment », Centre Léon-Bérard, Lyon, France.

<sup>2</sup>Fibermetrix Company, Strasbourg, France

**Running head :** Hormesis and individual radiosensitivity

**Keywords :** hormesis, adaptive response, radiosensitivity, radiation, ATM

Figures: 6

Table : 2

Pages: 37

No conflict of interest.

\* To whom correspondence should be addressed at: [Nicolas.foray@inserm.fr](mailto:Nicolas.foray@inserm.fr)

Dr. Nicolas Foray

INSERM UA8 Unit « Radiations: Defense, Health and Environment » - Bât Cheney A –  
Centre Léon-Bérard- 28 Rue Laennec 69008 LYON FRANCE

## ABSTRACT

Hormesis is a low-dose phenomenon that has been reported to occur, to different extents, in animals, plants and micro-organisms. However, a review of the literature shows that only a few reports describe it in humans. Also, the diversity of experimental protocols and cellular models employed makes deciphering the mechanisms of hormesis difficult. In humans, hormesis mostly appears in the 20-75 mGy dose range and in non-transformed, radioresistant cells. In a previous paper (Devic et al., 2018), a biological interpretation of the adaptive response (AR) phenomenon was proposed using our model which is based on the radiation-induced nucleoshuttling of the ATM protein (the RIANS model). Here, we showed that the 20-75 mGy dose range corresponds to a maximum amount of ATM monomers diffusing into the nucleus while no DNA double-strand breaks is produced by radiation. These ATM monomers are suggested to help in recognizing and repairing spontaneous DNA breaks accumulated in cells and contribute to reductions in genomic instability and aging. The RIANS model also permitted the biological interpretation of hypersensitivity to low doses (HRS) - another low-dose phenomenon. Hence, for the first time to our knowledge, hormesis, AR and HRS can be explained using the same unified molecular model.



## Introduction

The scientific jargon is frequently the source of confusions, notably when the current use of a specific term does not necessarily correspond to its historical definition. This is notably the case of the terms “adaptive response” and “hormesis”<sup>1-4</sup>. In our previous report, these two terms were the subjects of a semantic study (Figure 1)<sup>5</sup> :

- **Adaptive response** (AR) is an old term widely used in the 19<sup>th</sup> century in evolutionary biology. It generally evokes a *long-term* adaptation of an organism for some generations. Progressively, the definition of AR changed. AR is now defined as “a process of adaptation which allows survival *under adverse conditions* independently of the duration of the adaptation”<sup>6</sup>. In 1984, Olivieri et al. first introduced this term in the radiation research field to describe a radiobiological phenomenon occurring after two successive doses<sup>7</sup>: the first one, the “priming” dose ( $d_{AR}$ ) precedes a certain period of time ( $\Delta t_{AR}$ ) and a higher “challenging” dose ( $D_{AR}$ ). The priming dose is generally lower than the challenging dose. After reviewing the reports dealing with AR, we proposed the following “operational” definition of the AR phenomenon : any radiobiological phenomenon occurring when the biological effect induced by  $d_{AR} + \Delta t_{AR} + D_{AR}$  is lower than that induced by  $D_{AR}$  alone<sup>5</sup>.
- **Hormesis** : The term “hormesis” (from the ancient Greek meaning *stimulus*) is more recent and less frequently used than AR. “Hormesis” was first introduced in 1943 by Southam and Ehrlich who discovered that tree bark extracts stimulate fungi growing at low concentrations and is toxic at high concentrations<sup>8</sup>. Luckey first introduced the term “hormesis” in the radiation research field in the 1980s<sup>9,10</sup>. As reviewed by Calabrese, hormesis can be described as a J- or U-shaped dose- or dose-rate-dependent phenomenon, associated with a specific threshold under which stress is considered to be “positive” and above which it is detrimental<sup>1-4</sup>.

Even if some authors have suggested that AR and hormesis obey the same intrinsic mechanisms, their molecular and cellular bases remain unknown<sup>1-4</sup>. In our previous review, we have shown that the occurrence and the extent of AR are dependent on individual radiosensitivity. Furthermore, we proposed a biological explanation for AR, based on the radiation-induced nucleoshuttling of the ATM protein kinase (RIANS)<sup>5</sup>. Here, in order to help elucidate the specific mechanisms of hormesis, we have systematically applied the approach developed for AR<sup>5</sup>: 1) to review the experimental protocols, the cellular models, the biological and clinical endpoints and the data related to the hormesis phenomenon; 2) to propose a biological interpretation for hormesis from the RIANS model. In order to avoid any interspecies bias, we deliberately focused, as a first step, on human data since it was the basis of the RIANS model<sup>11</sup>.

#### **Radiation hormesis in humans: few data available in literature**

*Why are extrapolations from micro-organisms/vegetal/animal data to humans not reliable?*

With regard to the radiation response, there are two major interspecies differences, at least : DNA repair pathways and nucleus size:

- DNA double-strand breaks (DSB) are considered as the key-damage of lethality if unrepaired and of carcinogenesis if misrepaired<sup>12</sup>. There are two major DSB repair pathways:
  - the non-homologous end-joining (NHEJ) pathway consists in joining the broken DNA ends. This pathway is mainly active in quiescent cells and therefore predominant in mammals and especially in humans<sup>13</sup>.
  - the recombination pathway, whether non-homologous or homologous consists in inserting a DNA fragment in the hole formed by the DNA break. This pathway is mainly active in proliferating cells. The relative importance of the recombination pathway is therefore lower in human cells and healthy tissues than in animal cells and tumors. However, in the case of syndromes associated

with cancer proneness, the lack of control of recombination, also called *hyper-recombination*, may generate a significant accumulation of errors through misrepaired DSB and chromosome aberrations. Heterozygous mutations of *BRCA1*, *BRCA2*, *p53*, *BLM*, *FANC* genes that confer high risk of cancer are generally associated with hyper-recombination. Hyper-recombination is also a specific feature of transformed and tumor cells<sup>13</sup>.

Hence, the relative contribution of NHEJ and recombination in irradiated animal/plants/micro-organisms models can be very different from that observed in humans.

- In addition to the competition between NHEJ and recombination, species differ by the length of their genome that conditions the size of the nucleus and consequently, the chromatin condensation. For example, in rodent cells, cell nuclei are generally smaller and chromatin condensation is generally higher than in humans<sup>14</sup>. One of the major consequences of these features is that rodents are more radioresistant than humans with an average 50% lethal dose of about 15 and 4.5 Gy, respectively. Consequently, radiation-induced cellular death (radiosensitivity), transformation (radiosusceptibility) and accelerated aging (radiodegeneration) are not observed in the same dose ranges according to the species considered.<sup>13</sup> Particularly, at a dose that may cause cellular death in human cells, rodent models may appear more permissive to non-lethal cellular transformation while no significant effect is observed in micro-organisms. Furthermore, data obtained with some specific endpoints may be interpreted differentially according to the species considered. For example, while a higher proliferation rate may appear positive for micro-organisms placed in extreme conditions, it can be considered as negative and a sign of cellular transformation for human healthy tissues. Hence, to interpret a radiobiological phenomenon as hormetic should be based on **objective criteria** depending on the species considered.

Altogether, despite the number of data accumulated in animals and micro-organisms, these examples show that the occurrence of hormesis phenomenon with certain species cannot be simply extrapolated to human data.

#### *General features of the literature data about radiation hormesis in humans*

As a first step, we have inventoried the peer-reviewed papers 1) in which the term “radiation hormesis” is cited, 2) published in English from 1980 to 2019, 3) with an abstract available and 4) referenced in the Pubmed or in the Web of Science™ databases. From these criteria, 270 and 469 articles were found, respectively (Table 1). It is noteworthy that such numerical differences are likely due to the definition of the research criteria in both databases. Furthermore, a number of reports that concern hormesis may not have been inventoried if the authors did not mention the term “radiation hormesis” in the title or in the abstract.

As a second step, and despite the limitations described above, a small subset of 24 reports involving original human data mentioned in the title or in the abstract was identified. It represents 8.8 and 5.1 % of all the inventoried papers, respectively<sup>15-38</sup> (Tables 1 and 2). By analyzing these reports, three major conclusions can be drawn:

- There are few original human data about hormesis. They are mainly distributed into *in vitro* or *ex vivo* single dose experiments, epidemiological and isolated clinical cases studies. In agreement with Luckey<sup>9</sup>, growth rate, growth development, reproduction, immune reactions, cancer incidence, lifespan, cell survival, cell death pathways, cytogenetics and DNA damage induction and repair can be considered as the major endpoints used in the inventoried reports dealing with radiation hormesis (Table 2).

However, most of these endpoints are not equally represented in human data and the description of the hormesis phenomenon may depend on the choice of the endpoint.

- Among the 15 different cell lines used in the *in vitro* experiments, 7 are tumor or immortalized cell lines (Table 2). Again, the description of the hormesis phenomenon may also depend on the type of cells chosen. Indeed, even if the transformed, immortalized or tumor cells grow faster than primary cells *in vitro*, they do not necessarily reflect the radiation response of healthy tissues, notably the radiosensitivity (radiation-induced cell death), the radiosusceptibility (radiation-induced cell transformation) and the radiodegeneration (radiation-induced cell aging) reactions <sup>13</sup>. With regard to non-transformed cells, hormesis has been observed in normal lung, prostate, blood, and endothelium tissues (Table 2).
- Among the human hormesis data, the great majority of epidemiological studies concern cancer incidence/mortality of A-bomb survivors, which may represent an actual limitation to document hormesis, since radiation can influence the incidence of a wide range of non-cancer diseases. These three points are discussed below.

#### *Analysis of in vitro and ex vivo studies about radiation hormesis in humans*

There are two types of *in vitro* studies dealing with hormesis in human cells: those that consist in an exposure to a single dose or dose-rate and those that obey the AR protocols (as described in Introduction). With regard to the single dose or dose-rate studies, Table 2 shows that experimental protocols vary drastically. Notably, the investigated dose-rates varied from 0.1 mGy/min to 0.5 Gy/min and are so different that no rigorous conclusion can be drawn about the dose-rate range in which hormesis may occur. By contrast, the most frequent doses at which hormesis was observed in human cells belong to the [10-100 mGy] dose range and maximal extents belong to the [20 -75 mGy] (Table 2). This dose range is consistent with other reports in which hormesis is not mentioned in the title and the abstract, at least. For example, by using a normal human embryonic lung fibroblasts, Velegzhaninov et al. (2018)

showed that a single dose of 30 to 50 mGy resulted in decreasing senescence, which strongly suggests hormesis<sup>39</sup>.

While cell proliferation and clonogenicity are the most frequent endpoints used in the *in vitro* studies dealing with radiation hormesis in human cells, the analysis of the Table 2 suggests that hormesis is more generally observed in normal than in tumor cells. For example, by applying doses ranging from 20 to 100 mGy, Liang et al. (2016) showed that cell proliferation was significantly increased in fibroblasts through the activation of both MAPK/ERK and PI3K/AKT pathways but not in tumors<sup>28</sup>. Similarly, Yang et al. (2016) pointed out hormesis in human lung epithelial but not in lung adenocarcinoma cells<sup>30</sup>. In addition, the cell lines in which hormesis has been observed were found rather radioresistant. Indeed, the available cell survival data of the cell lines used in the 24 reports described in Table 2 showed a surviving fraction at 2 Gy of more than 50%, suggesting intrinsic radioresistance. Furthermore, there is no hormesis data available with the hyper-radioresistant cellular models like fibroblasts providing from ataxia telangiectasia or tumor cell lines holding mutations in DNA repair genes<sup>13</sup>. Interestingly, our previous report showed that AR was preferentially observed in radiosensitive rather than radioresistant cells, which reveals an important difference between hormesis and AR phenomena.<sup>5</sup>

The *ex vivo* studies dealing with radiation hormesis in human cells also involve various experimental protocols: they generally consist in sampling blood plasma or cells from individuals exposed at a dose-rate belonging to the [1-15 mSv/year] range (Table 2). However, the exposures to radiation in this series of data are too different to establish a consensual explanation (cobalt-60-contaminated buildings, proximity to nuclear power plant, occupational exposure, high natural radiation background, etc...) (Table 2). Like for the *in vitro* studies, there is still no consensus for any mechanistic model to explain hormesis.

*Analysis of epidemiological and clinical case studies about radiation hormesis in humans*

The most famous example of hormesis in epidemiological studies is the decrease of the incidence of some cancers observed in the cohorts of A-bomb survivors.<sup>40,41</sup> Hiroshima data have suggested that the rate of leukemia deaths per 100000 persons determined in a 35 years period significantly decreases around an exposure of 75 mGy<sup>42</sup>. However, this conclusion is still a subject of controversies and debates. Furthermore, the authors did not necessarily mention the term “hormesis” in all their studies.<sup>43,44</sup> Interestingly, some other reports have also shown that cancer incidence or mortality decrease at doses belonging to the [20-75 mGy] range, when ovary, colon or breast cancers are considered.<sup>16,40</sup>

With regard to the dose-rate data, only three reports referenced in table 2 described a lower cancer incidence. All these reports concern elevated USA areas. These elevated areas were considered to be associated with higher radiation background.<sup>23-25</sup> However, the correlation coefficients were low and the direct link between altitude and natural radiation background may be a source of artefacts. Furthermore, a rigorous analysis of the statistical significance of the differences observed between the natural radioactivity values was not performed. A similar study conducted in Poland presented more convincing data between 0.5 to 4.6 mSv/an: for the first time, the hormesis effect was quantified with dose-rate and defined as a decrease by 1.17%/mSv/year of all cancer deaths.<sup>26</sup> However, this effect was found not statistically significant for lung cancers, probably because of smoking that represents a major confounding factor.<sup>26</sup>

Hence, the epidemiological and *ex vivo* studies dealing with human radiation hormesis suggest that if hormesis is caused by natural radiation background, it may preferentially concern the low rather than high radiation background areas with dose-rates belonging to the [0.5-15 mSv/year] range. Indeed, there is a lack of consensual evidence of an hormesis effect in the high levels background radiation areas. For example, while the levels of chromosome

aberrations have been found higher in circulating lymphocytes of Ramsar (Iran) inhabitants than in controls, neither detrimental nor beneficial (hormetic) effect was demonstrated<sup>45</sup>. It is noteworthy that the [0.5-15 mSv/year] dose-rate range corresponds to the worldwide average radiation background, which may make detecting hormesis difficult.

In addition to the epidemiological data, there are some isolated clinical case reports that have revealed hormesis, but, again, they represent a very reduced number of cases. The case reports referenced in Table 2 concern one rheumatoid arthritis patient treated by hot spring radon therapy<sup>35</sup> and 3 other patients with prostate cancer, prostate cancer with bone metastasis, and ulcerative colitis who were submitted to repeated low-dose treatment<sup>31</sup>. Because of the poor number of cases and since they do not present any quantitative features, these two reports cannot be rigorously considered as significant proofs of the existence of hormesis even if they may suggest that hormesis is not limited to a decrease of cancer risk (Table 2).

#### *Radiation hormesis in humans: the AR data*

The AR phenomenon can theoretically be considered as hormesis if the biological effect is plotted against  $d_{AR}$  (Figure 1). As reviewed in our previous report<sup>5</sup>, from the 1980s until to date, the AR response has been observed with the  $d_{AR} + \Delta t_{AR} + D_{AR}$  scenario and with the following values: [1-500 mGy] for  $d_{AR}$ , [1-48 h] for  $\Delta t_{AR}$  and [0.1-6 Gy] for  $D_{AR}$ . In about 90% of reports,  $d_{AR}$  was found lower than 50 mGy and higher than 1 mGy<sup>5</sup>. However, in each report, there was no AR data enough to plot the biological effect against a series of  $d_{AR}$  doses in order to reflect the existence of the hormesis phenomenon as defined in Introduction.



### **Radiation hormesis in humans: some quantitative features**

From the review described above, hormesis appeared to be more frequently observed in human untransformed radioresistant cells exposed at the doses belonging to the [20-75 mGy] range and delivered at high dose-rate or else at low dose-rate belonging to the [0.5-15 mSv/year] range during a long period of time (Table 2). However, it must be stressed that the statistical robustness of single dose and dose-rate data are unequal. Indeed, the [0.5-15 mSv/year] dose-rate range is supported by few epidemiological studies based on calculated risks and in which a number of confounding factors (altitude, radiation background, smoking,...) have not been considered. Furthermore, these dose-rates values are so close to the lower limit of natural radiation background that the existence of any radiobiological phenomenon has to be considered with caution. Conversely, the same [20-75 mGy] dose range was obtained in *in vitro*, *ex vivo*, and epidemiological studies with different cell lines and subpopulations and with different endpoints in an independent manner. Hence, at this stage of the paper, we deliberately focused on hormesis occurring in the [20-75 mGy] dose range.

What does happen in human cells when irradiated at the [20-75 mGy] range? The DNA damage repair and signaling is a key-process of the individual response to radiation. These DNA damage induction rates are proportional to the radiation dose. They are not dependent on the radiosensitivity status of cells but can vary with the size of the nucleus. In untransformed human fibroblasts, a dose of 1 Gy X- or  $\gamma$ -rays simultaneously induces about 10000 base damage (BD), 1000 DNA single-strand breaks (SSB) and 40 DNA double-strand breaks (DSB) per cell.<sup>13,46</sup> These DNA damage induction rates are lower in lymphocytes<sup>13</sup>. A [20-75 mGy] dose range corresponds to the induction of 200-750 BD, 20-75 SSB and 0.8-3 DSB per fibroblast and much less in human lymphocytes. At doses lower than 25 mGy, no radiation-induced DSB is expected. At doses lower than 1 mGy, no radiation-induced SSB is

expected. In human radioresistant cells, a background of 0-2 spontaneous DSB is generally observed<sup>47</sup>. Hence, an exposure to the doses belonging to the [20-75 mGy] range results in a number of DNA damage at the same order as spontaneous DNA damage background. Conversely, in radiosensitive cells, there is more spontaneous DNA damage and some additional DNA damage may be also produced during repair in response to irradiation because of genomic instability.<sup>13</sup> Hence, the total yield of DNA damage induced at [20-75 mGy] may be much higher in radiosensitive than radioresistant cells. It was therefore not surprising that Table 2 suggests that hormesis is preferentially observed in radioresistant cells. Hence, an exposure to [20-75 mGy] may cause an oxidative stress facilitating biochemical processes that are not deleterious for cells but without producing DSB. Besides, some authors proposed the term “eustress” to describe such “positive” stress.<sup>48</sup> However, no mechanistic model linking molecular, cellular and clinical aspects has been proposed to explain *quantitatively* the positive role of such eustress in human cells.

#### **Radiation hormesis in humans: towards a model requiring the ATM kinase?**

The ATM protein kinase is a key-protein of the molecular and cellular response to ionizing radiation and notably, a very important actor of the DSB signaling and repair pathways. In 2016, we have proposed a model based on the radiation-induced ATM nucleoshuttling (RIANS) to explain the individual response to radiation<sup>11,47,49</sup>. In the frame of this model, the radiation-induced oxidative stress induces DNA damage in the nucleus and the monomerization of ATM dimers in both cytoplasm and nucleus, in a linearly dose-dependent manner: the resulting ATM monomers can diffuse in the nucleus and trigger the DSB recognition via the phosphorylation of the H2AX histone ( $\gamma$ H2AX)<sup>11,49</sup>. The  $\gamma$ H2AX phosphorylation, visible by immunofluorescence by the formation of  $\gamma$ H2AX foci is the first step of DSB repair via NHEJ pathway, the major DSB repair pathway in humans. The

presence of ATM in the nucleus also inhibits the MRE11-dependent recombination-like error-prone DSB repair pathway that leads to misrepaired DSB and cancer proneness.<sup>11,49,50</sup> Any delay in the RIANS leads to a radiosensitivity and/or radiosusceptibility phenotype. Hence, in the frame of RIANS model, radioresistant (namely group I) cells are characterized by a fast RIANS while cells with moderate radiosensitivity (namely group II) elicit a delayed RIANS. Hyper-radiosensitive (namely group III) cells show either a normal RIANS but a gross DSB repair defect due to deleterious mutations in DSB repair genes or a total absence of functional RIANS due to *ATM* mutations<sup>47,51,52</sup>

In the frame of the RIANS model, the number of radiation-induced DSB,  $N_{\text{DSB}}$ , the number of radiation-induced ATM monomers,  $N_{\text{mono}}$ , the number of ATM monomers that diffuse in the nucleus,  $N_{\text{diff}}$ , and the number of radiation-induced ATM monomers that recognized one DSB through the  $\gamma$ H2AX phosphorylation,  $N_{\text{rec}}$ , obey the following formulas, respectively<sup>49</sup>:

$$N_{\text{DSB}}(D) = I_{\text{DSB}} D \quad (1)$$

$$N_{\text{mono}}(D) = I_{\text{mono}} D \quad (2)$$

$$N_{\text{diff}}(t, D) = \frac{SP}{L \chi_{\text{mono}}} \ln(1 + \chi_{\text{mono}} I_{\text{mono}} D t) \quad (3)$$

$$N_{\text{rec}}(t, D) = \frac{1}{\rho} N_{\text{diff}}(t, D) \quad (4)$$

in which  $I_{\text{DSB}}$  is the rate of the production of DSB per Gy;  $I_{\text{mono}}$  is the rate of the production of ATM monomers per Gy. Furthermore, the nuclear membrane is characterized by a width  $L$ , a nucleus surface  $S$ , a permeability  $P$ . Lastly,  $\chi_{\text{mono}}$  is defined as the ATM monomers *reassociation* coefficient and  $\rho$  as the DSB recognition coefficient.<sup>49</sup>

The formula (3) permits to determine the number of nuclear ATM monomers at a given post-irradiation time  $t$ . Indeed, the  $t$ -integral of  $N_{\text{diff}}(t, D)$ ,  $N_{\text{diff}}^{\text{tot}}(t, D)$ , represents the total number of ATM monomers that has diffused in the nucleus during a given period of time  $0-t$  :

$$N_{\text{diff}}^{\text{tot}}(t, D) = \int_0^t N_{\text{diff}}(t, D) dt = \frac{\text{SP}}{\text{L} \chi_{\text{mono}}} \left[ (t + 1/\chi_{\text{mono}} I_{\text{mono}} D) \ln (1 + \chi_{\text{mono}} I_{\text{mono}} D t) - t \right] \quad (5)$$

By using the numerical values validated in Bodgi and Foray (2016) from hundreds human fibroblasts with different radiosensitivity <sup>49</sup>, the diffusion of ATM monomers, whether represented as instantaneous or cumulative values, was simulated for two representative radioresistant (solid line) and radiosensitive (dotted line) cell lines at different post-irradiation times (Figure 2). The cumulative number of ATM monomers increased very rapidly with dose: for example, in the first 10 min post-irradiation, the number of active nuclear ATM monomers in radioresistant cells (solid lines) varies from 17000 to 47000 after an exposure to 20 and 75 mGy, respectively (Figure 2A). This cumulative number does not change significantly with radiosensitivity since these values become 13000 and 36000 in radiosensitive cells, respectively (dashed line) (Figure 2A). However, when these values are considered with the number of radiation-induced DSB, the picture changes. Indeed, while the number of ATM monomers that diffuse in nucleus increases with dose, the number of nuclear ATM monomers *per radiation-induced DSB decreases*. The number of active nuclear ATM monomers *per radiation-induced DSB* in the [20-75 mGy] dose range appears 3-4 times higher than at 1 Gy in radioresistant cells (solid line) and 2-3 times higher than at 1 Gy in radiosensitive cells (Figure 2B). If we compared these values with the absolute number of ATM monomers that diffuse in nucleus at the same time (here, 10 min post-irradiation), the intercept of the curves corresponds to the maximal amount of ATM monomers that is not “consumed” to recognize radiation-induced DSB. This value is reached for both radioresistant and radiosensitive at a dose ( $d_{\text{HORM}}$ ) of about 25 mGy (Figure 2B). At such dose, hormesis is

supposed to be maximal. Interestingly, this dose also corresponds to the induction of less than 1 DSB per cell, which is in very good agreement with the hypothesis that hormesis may occur when ATM kinase activity in the nucleus is maximal *in the absence of any radiation-induced DSB* (Figure 2).

Literature and our data are therefore consistent with the existence of an hormesis phenomenon preferentially observed in radioresistant cells and triggered by a single dose belonging to the [20-75 mGy] dose range. The common feature of the radioresistant cells is a complete radiation-induced DSB recognition and repair for doses lower than or equal to 2 Gy.<sup>47</sup> However, even if radiation-induced DSB recognition and repair are complete, some radioresistant cells may show a low but significant genomic instability reflected by spontaneous SSB due to spontaneous reactive oxygen species or nuclease activity.<sup>53</sup> At doses belonging to the [20-75 mGy] range, the number of radiation-induced SSB do not exceed 75 SSB per cell, which is statistically not sufficient to create additional DSB. However, high spontaneously nuclease activity may also contribute to the aging and genomic instability by increasing spontaneous DNA damage<sup>53,54</sup>. For example, a significant amount of spontaneous SSB may influence the cellular metabolism: a flux of additional nuclear ATM monomers (like that produced in the [20-75 mGy] dose range) may help in reducing the biological consequences of spontaneous DNA breaks and their impact on genomic instability and aging.

In the frame of the RIANS model, as far as the endpoints chosen are dependent on the nuclear ATM kinase activity, the biological consequences of hormesis may be of great diversity. Indeed, the protein kinase ATM was shown to be upstream a cascade of phosphorylation of its substrates by obeying a functional and temporal hierarchy: phosphorylation of the ATM substrates involved in DNA damage recognition, then in DNA damage repair, then in cell cycle checkpoint and finally in cellular death pathways.<sup>55</sup> Furthermore, the ATM kinase activity is required to insure genomic integrity and inhibition of

any abnormal cellular process.<sup>55</sup> Interestingly, all the steps of the molecular and cellular response to radiation cited in Table 2 are known to be facilitated by a very high ATM kinase nuclear activity, which makes the RIANS model consistent with the hormesis phenomenon. The consequences of a high ATM kinase activity can also be observed downstream cellular scale. This is notably the case of clinical features occurring at the tissue scale like immune and inflammation reactions.<sup>55</sup> **However, further experimental data related to ATM are needed to establish a quantitative and qualitative link between cellular event and tissue reactions.** **Furthermore,** all these endpoints cannot describe an hormesis phenomenon at the same extent. For example, the recognition and the repair of DSB and chromosome damage are “bounded” notions: when all the damage are recognized or repaired, an hormetic dose cannot help in recognizing or repairing more. Consequently, if the recognition or the repair of DSB and chromosome damage is taken as an endpoint, the dose-response may show a threshold but not a J-shaped curve and therefore cannot reveal hormesis as defined in Introduction.

Hence, in the frame of RIANS model, hormesis may be dependent on the nuclear ATM kinase activity and help in reducing spontaneous cell death, genomic instability and aging in radioresistant cells. Further investigations are however needed to consolidate such hypothesis.

### **Towards a unified mechanistic model for the specific low-dose phenomena?**

#### *Interpretation of HRS phenomenon in the frame of the RIANS model*

The RIANS model provides a relevant explanation for other specific low-dose effects like HRS<sup>49</sup> and AR<sup>5</sup>. At this stage, we found useful to investigate whether the RIANS model may unify these specific low-dose phenomena. Let us focus on single dose phenomena and summarize our previous findings about the HRS phenomenon:

- *Major features* : first described by Lambin et al (1993)<sup>56</sup> and Marples and Joiner (1993)<sup>57</sup>, the HRS phenomenon results in a significant reduction of clonogenic cell

survival, increase of chromosome breaks, micronuclei, unrepaired DSB or gene mutations after a single low-dose  $d_{\text{HRS}}$  generally belonging to the [100-800 mGy] dose range. The maximal HRS effect is generally obtained at  $d_{\text{HRS}} = 200$  mGy and corresponds to a biological effect equivalent to a dose 5 to 10 times higher<sup>58,59,60</sup>. Unlike hormesis, HRS has been more generally observed in human cells with moderate radiosensitivity (group II) rather than in radioresistant one (group I).<sup>5</sup>

- *Interpretation of the RIANS model:* in the HRS-positive cells, the number of ATM monomers that diffuse in the nucleus is not sufficient enough to permit the full recognition of the radiation-induced DSB. Consequently, although the number of radiation-induced DSB is low at  $d_{\text{HRS}}$  (about 8 DSB per cell at 200 mGy), the number of unrepaired or misrepaired DSB remaining 24 h after irradiation can reduce survival or increase transformation. The numerical relevance of the RIANS model to explain HRS was published elsewhere (Figures 3 and 4).<sup>49</sup>

Altogether, the literature and our data suggest that:

- Radioresistant (group I) cells are not HRS-positive but may be hormesis-positive
- Radiosensitive (group II) cells may be HRS-positive but are not hormesis-positive
- Hyper-radiosensitive (group III) cells are neither HRS- nor hormesis-positive

#### *The HRS and hormesis contributions in the debate about low-dose and low dose-rate effects*

The HRS and hormesis phenomena are specifically observed in radiosensitive and radioresistant cells, respectively. What are the relative contributions of these two phenomena in the linear non-threshold (LNT)/non-linear threshold (NLT) models? The hormesis and HRS phenomena are revealed by a J- and a  $\Lambda$ -shaped dose-dependent curves, respectively. At high dose-rate (like for the Japanese atomic bomb), hormesis and HRS occur at distinct dose ranges ([20-75 mGy] and [100-800 mGy], respectively). There is a number of examples of

data showing both HRS and hormesis with a peak around 200 mGy and a reverted peak around 25 mGy. This is notably the case of the relative risk about solid tumor incidence among the Japanese atomic bomb survivors<sup>41,61,62</sup> (Figure 5A-D).

In the epidemiological data obtained from individuals exposed to lower dose-rates (like for nuclear workers), the general slope of the relative risk decreases, which is consistent with a lower rate of DSB induction and a longer time allocated to repair DNA damage<sup>63</sup> (Figure 5E). However, in these cases, the peak reflecting HRS is found shifted to lower values (about 150 mGy in the example shown in Figure 4E). How to explain this trend? In a previous report, the maximal HRS effect was found to correspond to a constant irradiation time of less than 30 s irrespective of dose, dose-rate and cellular model<sup>59</sup>. Consequently, the lower the dose-rate, the lower the dose  $d_{\text{HRS}}$ . Hence, from these hypotheses, we can propose a general model in which the risk decreases with dose-rate together with the dose at which HRS is maximal (Figure 5F). Interestingly, our previous paper about HRS predicts that  $d_{\text{HRS}}$  is included in the [20-75 mGy] range for dose-rates lower than 0.1 Gy/min<sup>59</sup>. In other terms, HRS and hormesis can compensate each other for dose-rates lower than 0.1 Gy/min and a horizontal threshold should appear, which may render more difficult a **significant** discrimination of both phenomena (Figure 5F). Although further investigations are needed to consolidate this model, it is the first time to our knowledge that dose-rate is included in a model of risk whose mechanistic interpretation is proposed. **It is noteworthy that the available data do not permit to predict hormesis with repeated/chronic exposures yet.**

We examined thereafter the conditions of the occurrence of both hormesis and HRS phenomena in the frame of the LNT/NLT models. Interestingly, by simulating radiosensitive and radioresistant subpopulations, the LNT model appears to be numerically incompatible with both hormesis and HRS phenomena while the NLT models seems to be more permissive (Figure 6). Hence, if significant subpopulations of radioresistant hormesis-positive individuals



and radiosensitive HRS-positive individuals exist, the NLT can take into account them as far as the statistical error is acceptable. Again, further investigations are needed to document this hypothesis.

### **Conclusions**

Hormesis is an experimentally validated radiobiological phenomenon observed in a variety of cellular models, with numerous experimental protocols and with various molecular, cellular and clinical endpoints that describe a J-shaped dose-response. However, when the human data are considered, the number of reports about hormesis is very low. Still to date, no mechanistic model describing hormesis has been proposed. From a review of literature, hormesis appears to occur in the [20-75 mGy] dose range and preferentially in human radioresistant cells/individuals. This dose range corresponds to less than 1 radiation-induced DSB per cell. In the frame of the RIANS model, hormesis appears to correspond to a maximal yield of active ATM monomers in the nucleus while no DSB is induced by radiation. Such amount of ATM monomers may contribute to reduce spontaneous oxidative stress, genomic instability and aging with various beneficial consequences. Interestingly, the RIANS model also permits the description of the HRS phenomenon that generally occurs around 200 mGy. For the first time to our knowledge, these two low-dose specific phenomena can be considered together in the same unified mechanistic model.

### **Acknowledgements**

We thank Christiane Beaufrère for her technical help. The PhD thesis of C.D. is supported by Fibermetrix company. The post-doctoral fellowship of M.L.F is supported by the Centre National d'Etudes Spatiales (CNES). This work was supported by the Commissariat General à l'Investissement (Programmes Investissement d'avenir – INDIRA project).

## Reference

1. Calabrese EJ, Baldwin LA. Radiation hormesis : its historical foundations as a biological hypothesis. *Human and Experimental toxicology*. 2000;19:41-75.
2. Calabrese EJ. Hormesis: a fundamental concept in biology. *Microb Cell*. 2014;1(5):145-149.
3. Calabrese EJ, Bachmann KA, Bailer AJ, et al. Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007;222(1):122-128.
4. Sanders CL. *Radiobiology and radiation hormesis*. Berlin, Germany: Springer International Publishing AG; 2017.
5. Devic C, Ferlazzo ML, Foray N. Influence of Individual Radiosensitivity on the Adaptive Response Phenomenon: Toward a Mechanistic Explanation Based on the Nucleo-Shuttling of ATM Protein. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*. 2018;16(3):1-11.
6. Schwab M. *Encyclopedia of cancer*. Heidelberg, Germany: Springer; 2011.
7. Olivieri G, Bodycote J, Wolff S. Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science*. 1984;223(4636):594-597.
8. Southam C, M. , Ehrlich J. Effects of Extract of western red-cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture. . *Phytopathology*. 1943;33:517-524.
9. Luckey TD. *Hormesis with ionizing radiation* New York, USA: CRC Press; 1980.
10. Calabrese EJ. Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists. *Environ Toxicol Chem*. 2008;27(7):1451-1474.
11. Berthel E, Foray N, Ferlazzo ML. The Nucleoshuttling of the ATM Protein: A Unified Model to Describe the Individual Response to High- and Low-Dose of Radiation? *Cancers*. 2019;11(7).
12. Jeggo PA, Lobrich M. DNA double-strand breaks: their cellular and clinical impact? *Oncogene*. 2007;26(56):7717-7719.
13. Foray N, Bourguignon M, Hamada N. Individual response to ionizing radiation. *Mutation Research Review*. 2016;770:369-386.
14. Lohr D, Corden J, Tatchell K, Kovacic RT, Van Holde KE. Comparative subunit structure of HeLa, yeast, and chicken erythrocyte chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977;74(1):79-83.
15. Kato H, Schull WJ, Awa A, Akiyama M, Otake M. Dose-response analyses among atomic bomb survivors exposed to low-level radiation. *Health physics*. 1987;52:645-652.

16. Mine M, Okumura Y, Ichimaru M, Nakamura T, Kondo S. Apparently beneficial effect of low to intermediate doses of A-bomb radiation on human lifespan. *International Journal of Radiation Biology*. 1990;58:1035-1043.
17. Palm S, Bäck T, Claesson I, et al. Effects of the alpha-particle emitter At-211 and low-dose-rate gamma-radiation on the human cell line Colo-205 as studied with a growth assay. *Anticancer Research*. 1998;18:1671-1676.
18. Lee YT, Sung FC, Lin RS, et al. Peripheral blood cells among community residents living near nuclear power plants. *Sci Total Environ*. 2001;280(1-3):165-172.
19. Chen WL, Luan YC, Shieh MC, et al. Effects of cobalt-60 exposure on health of Taiwan residents suggest new approach needed in radiation protection. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*. 2006;5(1):63-75.
20. Rithidech KN, Scott BR. Evidence for radiation hormesis after in vitro exposure to human lymphocytes to low doses of ionizing radiation *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*. 2008;6:252-271.
21. Gamulin M, Garaj-Vrhovac V, Kopjar N, et al. DNA and cytogenetic damage in white blood cells of postmenopausal breast cancer patients treated with radiotherapy. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*. 2010;45(3):292-304.
22. Monfared AS, Hajian K, Hosseini R, Nasir A. Association between Local External Gamma Rays and Frequency of Cancer in Babol-Iran. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*. 2010;8(3):368-377.
23. Thompson RE. Epidemiological Evidence for Possible Radiation Hormesis from Radon Exposure: A Case-Control Study Conducted in Worcester, MA. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*. 2010;9(1):59-75.
24. Hart J. Cancer mortality for a single race in low versus high elevation counties in the u.s. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*. 2011;9(3):348-355.
25. Hart J, Hyun S. Cancer mortality, state mean elevations, and other selected predictors. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*. 2012;10(1):58-65.
26. Fornalski KW, Dobrzynski L. The cancer mortality in high natural radiation areas in poland. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*. 2012;10(4):541-561.
27. Lehrer S, Rosenzweig KE. Lung cancer hormesis in high impact states where nuclear testing occurred. *Clin Lung Cancer*. 2015;16(2):152-155.
28. Liang X, Gu J, Yu D, et al. Low-Dose Radiation Induces Cell Proliferation in Human Embryonic Lung Fibroblasts but not in Lung Cancer Cells: Importance of ERK1/2 and AKT Signaling Pathways. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*. 2016;14(1):1559325815622174.
29. Lehrer S, Green S, Rosenzweig KE. Reduced Ovarian Cancer Incidence in Women Exposed to Low Dose Ionizing Background Radiation or Radiation to the Ovaries after Treatment for Breast Cancer or Rectosigmoid Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(6):2979-2982.
30. Yang G, Yu D, Li W, et al. Distinct biological effects of low-dose radiation on normal and cancerous human lung cells are mediated by ATM signaling. *Oncotarget*. 2016;7(44):71856-71872.
31. Kojima S, Tsukimoto M, Shimura N, Koga H, Murata A, Takara T. Treatment of Cancer and Inflammation With Low-Dose Ionizing Radiation: Three Case Reports. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*. 2017;15(1):1559325817697531.

32. Wang Y, Li Y, Yang L, Yin D. Intermittent low dose irradiation enhances the effectiveness of radio- and chemo-therapy for human colorectal adenocarcinoma cell line HT-29. *Oncology reports*. 2017;38(1):591-597.
33. Li SJ, Liang XY, Li HJ, et al. Low-dose irradiation inhibits proliferation of the p53null type human prostate cancer cells through the ATM/p21 pathway. *Int J Mol Med*. 2018;41(1):548-554.
34. Vieira Dias J, Gloaguen C, Kereselidze D, Manens L, Tack K, Ebrahimian TG. Gamma Low-Dose-Rate Ionizing Radiation Stimulates Adaptive Functional and Molecular Response in Human Aortic Endothelial Cells in a Threshold-, Dose-, and Dose Rate-Dependent Manner. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*. 2018;16(1):1559325818755238.
35. Kojima S, Thukimoto M, Cuttler JM, et al. Recovery From Rheumatoid Arthritis Following 15 Months of Therapy With Low Doses of Ionizing Radiation: A Case Report. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*. 2018;16(3):1559325818784719.
36. Kuciel-Lewandowska JM, Pawlik-Sobecka L, Placzkowska S, Kokot I, Paprocka-Borowicz M. The assessment of the integrated antioxidant system of the body and the phenomenon of spa reaction in the course of radon therapy: A pilot study. *Adv Clin Exp Med*. 2018;27(10):1341-1346.
37. Gaetani S, Monaco F, Bracci M, et al. DNA damage response in workers exposed to low-dose ionising radiation. *Occupational and environmental medicine*. 2018;75(10):724-729.
38. Wang Z, Sugie C, Nakashima M, et al. Changes in the Proliferation Rate, Clonogenicity, and Radiosensitivity of Cultured Cells During and After Continuous Low-Dose-Rate Irradiation. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*. 2019;17(2):1559325819842733.
39. Velegzhaninov IO, Ermakova AV, Klovov DY. Low dose ionizing irradiation suppresses cellular senescence in normal human fibroblasts. *International journal of radiation biology*. 2018;94(9):825-828.
40. Doss M. Evidence supporting radiation hormesis in atomic bomb survivor cancer mortality data. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*. 2012;10:584-592.
41. Ozasa K, Shimizu Y, Suyama A, et al. Studies of the mortality of atomic bomb survivors, Report 14, 1950-2003: an overview of cancer and noncancer diseases. *Radiation research*. 2012;177(3):229-243.
42. Shimizu Y, Schull WJ, Kato H. Cancer risk among atomic bomb survivors. The RERF Life Span Study. Radiation Effects Research Foundation. *JAMA*. 1990;264(5):601-604.
43. Holzman D. Hormesis: fact or fiction? *J Nucl Med*. 1995;36(12):13N-14N, 16N.
44. Little MP, Wakeford R, Tawn EJ, Bouffler SD, Berrington de Gonzalez A. Risks associated with low doses and low dose rates of ionizing radiation: why linearity may be (almost) the best we can do. *Radiology*. 2009;251(1):6-12.
45. Mortazavi SMJ, Mortazavi G, Mortazavi SAR, Paknahad M. Is induction of anomalies in lymphocytes of the residents of high background radiation areas associated with increased cancer risk? . *Journal of Biomedical Physics and Engineering*. 2019;9:367-372.
46. Iliakis G. The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 1991;13(12):641-648.

47. Granzotto A, Benadjaoud MA, Vogin G, 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):450-460.
48. Sies H, Feinendegen LE. Radiation Hormesis: The Link to Nanomolar Hydrogen Peroxide. *Antioxid Redox Signal*. 2017;27(9):596-598.
49. Bodgi L, Foray N. The nucleo-shuttling of the ATM protein as a basis for a novel theory of radiation response: resolution of the linear-quadratic model. *International journal of radiation biology*. 2016;92:117-131.
50. 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.
51. Pereira S, Bodgi L, Duclos M, et al. Fast and binary assay for predicting radiosensitivity based on the nucleoshuttling of ATM protein: development, validation and performances. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2018;100:353-360.
52. Vogin G, Bastogne T, Bodgi L, et al. The Phosphorylated ATM Immunofluorescence Assay: A High-performance Radiosensitivity Assay to Predict Postradiation Therapy Overreactions. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2018;101(3):690-693.
53. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*. 2014;24(10):R453-462.
54. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J*. 2003;17(10):1195-1214.
55. Foray N, Marot D, Gabriel A, et al. A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *The EMBO journal*. 2003;22(11):2860-2871.
56. Lambin P, Marples B, Fertil B, Malaise EP, Joiner MC. Hypersensitivity of a human tumour cell line to very low radiation doses. *International journal of radiation biology*. 1993;63(5):639-650.
57. 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(1):41-51.
58. Joiner MC, Marples B, Lambin P, Short SC, Turesson I. Low-dose hypersensitivity: current status and possible mechanisms. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2001;49(2):379-389.
59. 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.
60. Xue L, Yu D, Furusawa Y, Cao J, Okayasu R, Fan S. ATM-dependent hyper-radiosensitivity in mammalian cells irradiated by heavy ions. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2009;75(1):235-243.
61. Pierce DA, Preston DL. Radiation-related cancer risks at low doses among atomic bomb survivors. *Radiation research*. 2000;154(2):178-186.
62. Preston DL, Ron E, Tokuoka S, et al. Solid cancer incidence in atomic bomb survivors: 1958-1998. *Radiation research*. 2007;168(1):1-64.
63. Gillies M, Haylock R, Hunter N, Zhang W. Risk of Leukemia Associated with Protracted Low-Dose Radiation Exposure: Updated Results from the National Registry for Radiation Workers Study. *Radiation research*. 2019;192(5):527-537.

**Table 1: Number of peer-reviewed reports dealing with radiation hormesis provided by Pubmed and Web of Sciences databases <sup>a</sup>**

	PubMed database	Web of Science <sup>TM</sup> database
<b>General database features and nature of the documentary support</b>	30 million scientific « citations » including articles, reviews, letters, comments, books and book chapters	90 million « records » including articles, reviews, letters, comments, books, proceeding papers, meeting abstracts, notes, editorial materials,...
<b>“radiation hormesis” in “All fields”</b>	348 including 270 articles and 85 (31.4%) reviews	569 including 469 articles and 100 (17.5 %) reviews
<b>Studies involving original human data</b>	24 (8.8 %) among 270 articles	24 (5.1 %) among 469 articles
<b>“radiation hormesis” in “Title”</b>	45 including 38 articles and 7 (15.5%) reviews	69 including 53 articles and 16 (23.1 %) reviews
<b>Studies involving original human data</b>	2 (5.2 %) among 38 articles	2 (3.7 %) among 53 articles

<sup>a</sup>All the research was performed among the documents published in English, with an abstract and in the 1980-2019 period. However, it is noteworthy that the definition of “Articles” and the research criteria are different in both databases.

**Table 2: Original papers dealing with ionizing radiation hormesis involving human data and published between 1980 and 2019**

Reference	Brief materials and methods	Endpoints	Conclusions and interpretation of hormesis
<i>In vitro single dose experiments</i>			
Palm et al., 1998 <sup>17</sup>	Metastatic colon Colo-205 tumor cell line pre-exposed to At-211 alpha-emitter and gamma at low dose rate and followed by 1-2 Gy	Cell survival	AR-like protocol Hormesis or technical artefact at 1-2 Gy but at low dose rate (non-available value). Hormesis = enhanced cell survival
Rithidech and Scott, 2008 <sup>20</sup>	Peripheral blood lymphocytes from 5 apparently healthy volunteers irradiated at different type of radiation	Micronuclei	Less micronuclei at 10 mGy gamma-rays delivered at 0.5 Gy/min. At 50 mGy micronuclei yield becomes normal. Maximal extent at 20 mGy. Hormesis = decreased micronuclei yield
Liang et al 2016 <sup>28</sup>	Human non-transformed embryonic lung 2B fibroblast and lung NCI-H446 cancer cell lines irradiated at different doses (20-100 mGy) at 0.1Gy/min	Cell proliferation	Cell proliferation was significantly increased in fibroblasts but not in tumors via the activation of both MAPK/ERK and PI3K/AKT between 20 and 75 mGy at 0.1 Gy/min (maximum at 50 mGy) Hormesis = increased cell proliferation
Yang et al., 2016 <sup>30</sup>	A549 human lung adenocarcinoma and immortalized HBE135-E6E7 human lung epithelial cells irradiated at 12.5 mGy/min	Cell viability, clonogenicity Cell cycle, AKT pathway	Hormesis is observed in HBE cells but not in tumor between 20 and 100 mGy (maximum at 75 mGy) Hormesis = enhanced cell viability
Wang et al, 2017 <sup>32</sup>	Human colorectal adenocarcinoma cell line HT-29	Tumor cell growth	AR-like protocol. 250 mGy intermittent pretreatment significantly increases the killing effect of both radiotherapy and chemotherapy Hormesis = decreased cell survival for tumors

Li et al., 2018 <sup>33</sup>	Human prostate cancer cell line PC-3 and immortalized normal prostate cell line RWPE-1 exhibited differential biological responses X-ray irradiation at 12.5 mGy/min. Doses tested : 20-100 mGy	Tumor cell growth ATM/p21 pathway	Hormesis is observed between 50 and 100 mGy (maximum at 75 mGy). A dose of 75 mGy inhibited cell growth and arrested the cell cycle in PC-3 cells but not in RWPE-1 cells. The ATM/p21 pathway was activated in PC-3, but not in RWPE-1 cells. Hormesis = decreased cell proliferation for tumors
Vieira Dias et al., 2018 <sup>34</sup>	human primary aorta endothelial cells (HAoEC) pre-irradiated at 6 mGy/h for 15 days or at 1 Gy/min (cumulative doses tested : 50 mGy – 2 Gy) followed by 2 Gy	Cell growth and angiogenic activity	AR-like protocol Pre-irradiation at low dose-rate stimulates angiogenesis after 2 Gy. Hormesis = stimulation of angiogenic activity
Wang et al., 2019 <sup>38</sup>	Human salivary gland tumor cells exposed to low-dose emitters (4.3 and 27 $\mu$ Sv/h) (irradiation times tested : 2 – 6 weeks) followed by 2-8 Gy	Radiosensitivity, clonogenicity, proliferation rate, DSB repair with $\gamma$ H2AX foci	AR-like protocol No hormetic effect on proliferation and clonogenicity. Hormetic effect in cell survival and DSB repair Hormesis = enhanced cell survival and DSB repair
<i>Ex vivo single dose experiments</i>			
Lee et al., 2001 <sup>18</sup>	3602 residents living near nuclear power plant	Blood cell count	Higher white blood cell count in residents. Hormesis = more white blood cells
Chen et al, 2006 <sup>19</sup>	About 10000 residents of Cobalt-60 contaminated building receiving more than 15 mSv/y	Chromosomal aberration Cancer mortality Congenital malformations	Hormesis = No chromosomal aberration Lower cancer mortality Less congenital malformations
Gamulin et al 2010 <sup>21</sup>	Repair and cytogenetics features of peripheral blood lymphocytes of breast cancer patients investigated one year after adjuvant radiotherapy	DNA breaks Chromosome aberrations Micronuclei	Higher DNA breaks, chromosome aberrations and micronuclei in elderly patients. Hormesis? Hormesis = more DNA breaks and micronuclei?
Kuciel-Lewandowska et al. 2018 <sup>36</sup>	Total antioxidant status in the plasma of 35 patients suffering from degenerative joints and disc disease and treated by hot spring radon therapy	Total antioxidant status in ex vivo plasma	Increased antioxidant status in treated patients suffering from degenerative joints and disc disease Hormesis = more antioxidant

Gaetani et al., 2018 <sup>37</sup>	Lymphocytes from exposed workers from 1 to 6 mSv/y)	DNA damage and repair assessed with comet assay	Increased DNA repair activity was found in exposed workers and only subjects highly exposed accumulated DNA damage in their circulating cells supporting hormesis Hormesis = increased DNA repair capacity
<i>Epidemiology analyses</i>			
Kato et al., 1987 <sup>15</sup>	A-bomb survivors less than 50 cGy	Cancer mortality Cancer incidence Chromosomal aberrations Phytohemagglutinin response Mental retardation	No hormesis
Mine et al., 1990 <sup>16</sup>	290 male A-bomb survivors exposed to 50-149 cGy	Cancer mortality	Hormesis = lower cancer mortality
Monfared et al 2010 <sup>22</sup>	448209 residents and 832 registred cancers Dose rate of about 0.5 mSv/y	Cancer incidence	Poor correlation coefficient. Hormesis evoked with caution Hormesis = lower cancer incidence
Thompson 2010 <sup>23</sup>	a case-control study of lung cancer and residential radon exposure conducted in Worcester County, MA	Lung Cancer incidence	A statistically significant decrease in cancer risk with increased exposure was found for values $\leq 157$ Bq/m <sup>3</sup> ) Hormesis = lower cancer incidence
Hart 2010 <sup>24</sup>	Mortality rates in six US jurisdictions with “low” level radiation (62.5 mrem/y) and with “high” level radiation (78.5 mrem/y) background	Whole mortality rare cancer, heart disease, diabetes mortality rate	Lower mortality rates except for diabetes in higher level background jurisdictions. But indirect proof (altitude vs radiation background) Hormesis = lower mortality
Hart and Hyun 2012 <sup>25</sup>	Mortality rate in US vs mean land elevation	Whole cancer mortality rate	land elevation / natural background radiation is <i>inversely</i> related to cancer mortality Hormesis = lower cancer mortality
Fomalski and Dobrzynski, 2012 <sup>26</sup>	Mortality rate in poland vs natural radiation background between 1 to 4.6 mSv/y	Cancer mortality rate	Cancer mortality rate is lower in the higher radiation level areas. The decrease by 1.17%/mSv/year (p = 0.02) of all cancer deaths and by 0.82%/mSv/year (p = 0.2) of lung cancers only are observed Hormesis = lower cancer mortality

Lehrer and Rosenzweig, 2015 <sup>27</sup>	Lung cancer incidence vs highly-impacted by nuclear testing	Cancer incidence	High-impact states and higher radiation background are associated with lower lung cancer incidence. High-impact states were not designated according to measurements of background radiation. Hormesis = lower cancer incidence
Lehrer et al, 2016 <sup>29</sup>	Cancer incidence in treated breast cancer women in US (30.9 mGy to ovaries)	Cancer incidence	inverse relationship between ovarian cancer in white women and radon background radiation ( $r = -0.465$ , $p = 0.002$ ) Hormesis = lower cancer incidence
<i>Isolated clinical case reports</i>			
Kojima et al, 2017 <sup>31</sup>	3 cases of patients with prostate cancer, prostate cancer with bone metastasis, and ulcerative colitis submitted to repeated low dose (20 to 50 mGy/min with a total dose of 150 mGy) or to an hormesis room (radiation dose rate of about 11 $\mu$ Gy/h)	Prostate specific antigen (PASA) level Number of bowel movements	Some clinical criteria were decreased after low dose treatment but relevant controls and only 3 cases Hormesis = better clinical criteria
Kojima et al, 2018 <sup>35</sup>	One case study of a rheumatoid arthritis patient treated by hot spring radon therapy	Clinical features	Improvements of the clinical features Only one case Hormesis = better clinical criteria



## Legend to figures

**Figure 1: The major biological effects specific to low-dose.** **A:** The hormesis phenomenon is defined as a continuous J-shaped function of dose or dose-rate with beneficial effect. The maximal extent of hormesis is reached at the dose  $d_{\text{HORM}}$ ; **B:** The adaptive response (AR) is defined as an infra-additive effect observed after the succession of a priming  $d_{\text{AR}}$  and a challenging dose  $D_{\text{AR}}$  separated by a period of time  $\Delta t_{\text{AR}}$ . **C.** The hypersensitivity to low dose phenomenon (HRS) describes an excess of deleterious effect around the dose  $d_{\text{HRS}}$ .

**Figure 2: Number of ATM monomers that diffuse into the nucleus for radioresistant and radiosensitive cells.** Data plots represent the numerical simulations derived from the formula 5 (panel A) and 3 (panel B) validated in <sup>49</sup>. The following conditions were taken:  $S/L=100 \pi 10^{-6}$  and  $\chi_{\text{mono}} I_{\text{mono}}=1.5$  for (group I) radioresistant cells (solid lines) and 3.8 for (group II) radiosensitive cells (dotted lines) as proposed in <sup>49</sup>. The A panel shows the simulated data as a function of the dose with the indicated repair times. The B panel shows the simulated data as a function of the dose at 10 min divided by the number of DSB taken as  $40xD$  (black lines) or not (red lines).

**Figure 3: Schematic illustrations of the RIANS model to explain HRS and hormesis phenomena.** In (group II) radiosensitive cells, the HRS phenomenon is the result of the sequestration of radiation-induced ATM monomers (red symbols) by overexpressed ATM substrates (blue squares): some DSB remain either unrepaired or misrepaired. In (group I) radioresistant cells, hormetic doses may produce ATM monomers diffusing in nucleus without producing DSB. Such ATM monomers may contribute to reduce spontaneous DNA breaks, oxidative stress, genomic instability and aging.

**Figure 4: Schematic illustration of the HRS and hormesis phenomena as a function of dose.** When biological effect is plotted against dose, the HRS and hormesis phenomena are revealed by a J- and a  $\Lambda$ -shaped curves, respectively. These two low-dose phenomena reach their maximal extent at different doses,  $d_{\text{HORM}}$  and  $d_{\text{HRS}}$ .

**Figure 5: Representative examples of dose response curves showing both hormesis and HRS phenomena.** **A.** Solid cancer dose response from Hiroshima bomb survivors reproduced from the figure 3 of <sup>61</sup> with permission. The thick solid line is the fitted linear gender-averaged excess relative risk (ERR) dose response at age 70 after exposure at age 30 on data in the 0- to 2-Gy dose range. The points are non-parametric estimates of the ERR in dose categories. The thick dashed line is a non-parametric smooth of the category-specific estimates and the thin dashed lines are one standard error above and below this smooth <sup>61</sup>. **B.** Female breast cancer dose response from Hiroshima bomb survivors reproduced from the figure 14 of <sup>61</sup> with permission. Same characteristics as panel A <sup>61</sup>. **C.** Solid cancer dose response from Hiroshima bomb survivors reproduced from the figure 4 of <sup>41</sup> with permission. ERR for all solid cancer in relation to radiation exposure. The black circles represent ERR and 95% CI for the dose categories, together with trend estimated based on linear (L) with 95% CI (dotted lines) and linear-quadratic (LQ) models using the full dose range and, and LQ model for the data restricted to dose < 2 Gy <sup>41</sup>. **D.** Solid cancer dose response from Hiroshima bomb survivors reproduced from the figure 1 of <sup>62</sup> with permission. Age-specific cancer rate over the 1958-1994 follow-up period relative to those for an unexposed person, averaged over the follow-up and over sex, and for age at exposure 30. The dashed curves represent  $\pm$  standard error for the smoothed curve. The straight line is the linear risk estimate computed from the range 0-2 Sv. Because of apparent distinction between distal and proximal zero-dose

cancer rates, the unity baseline corresponds to zero-dose survivors with 3 km of the bombs. The horizontal dotted line represents the alternative baseline if the distal survivors were not omitted. The inset shows the same information for the fuller dose range <sup>62</sup>. E. Leukemia dose response from UK national registry for nuclear workers study reproduced from the figure 1 of <sup>63</sup> with permission. Non lymphatic leukemia ERR estimates and 90% CI two-year-lagged external cumulative dose category with linear ERR/Sv estimate and associated 90% CI reference lines <sup>63</sup>. F. Schematic illustration of the double occurrence of hormesis and HRS and its theoretical evolution as far as the dose-rate decreases (grey arrows). The dashed line shows theoretical data from lower dose-rate than those shown with solid line. The dotted line corresponds to theoretical data from dose-rate lower than 0.1 Gy/min with which hormesis and HRS compensate each other in an horizontal threshold. In all the panels, the red and green arrows indicate the maximal HRS and hormesis effect, respectively.

**Figure 6: Simulation of a biological effect of irradiation on a population composed of radioresistant and radiosensitive individuals.** We considered a LNT model for the radioresistant subpopulation (fixed at 80% of the whole population) and a NLT model radiosensitive subpopulation (fixed at 20% of the whole population). In addition, we considered that 20 % of radioresistant individuals exhibit hormesis (panel A) and 20% of radiosensitive individuals exhibit HRS (panel B). The panel C shows the weighted sum of the curves shown in panels A and B. The panel D shows the schematic illustration that the double occurrence of hormesis and HRS cannot be fitted properly by the LNT.

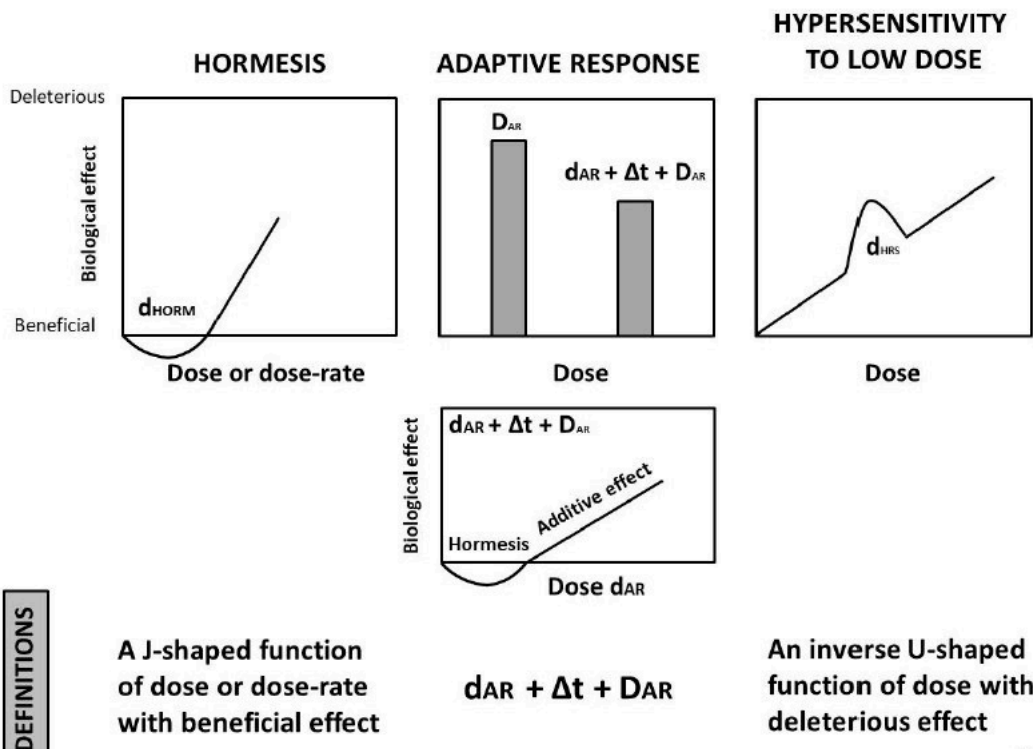


Fig1

Review

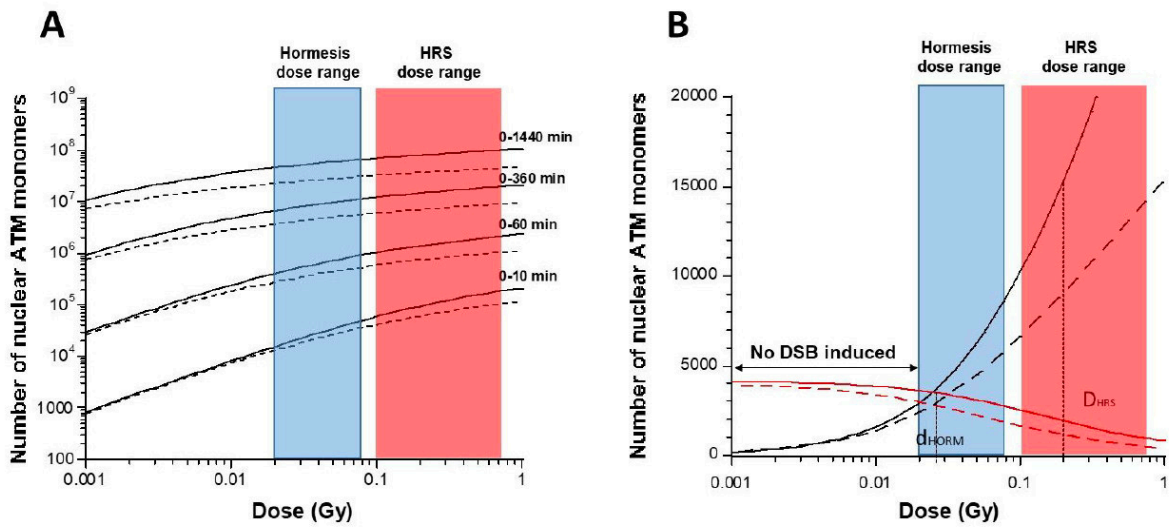


Fig 2

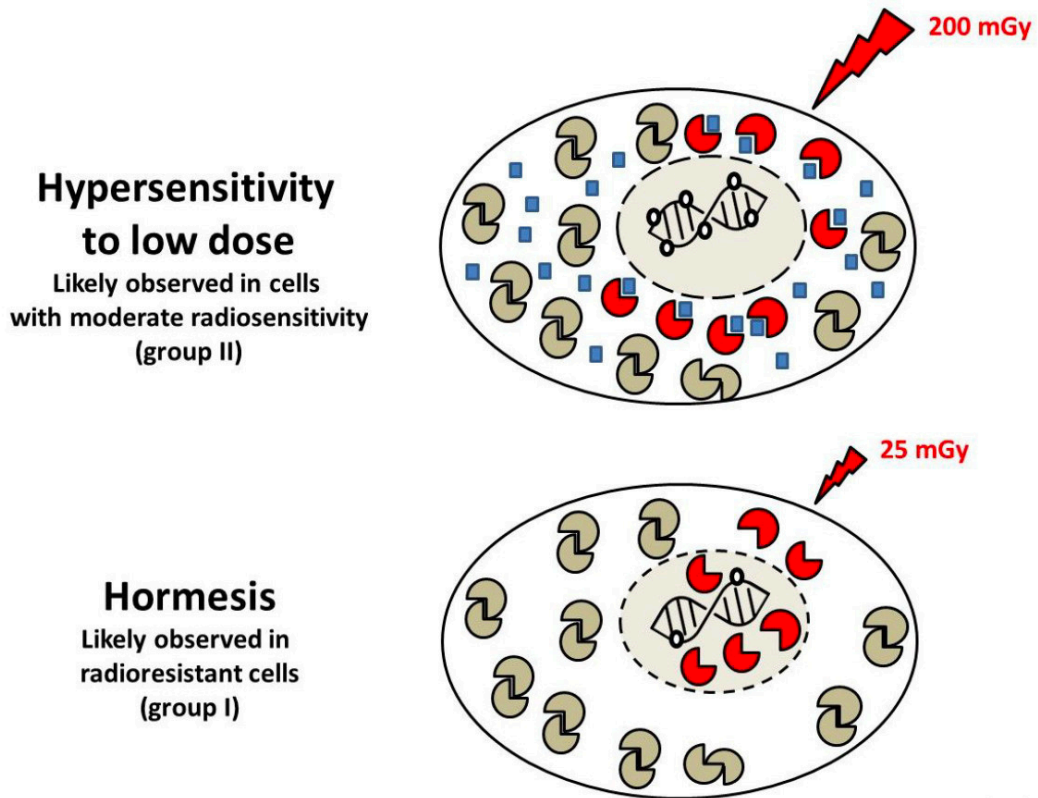
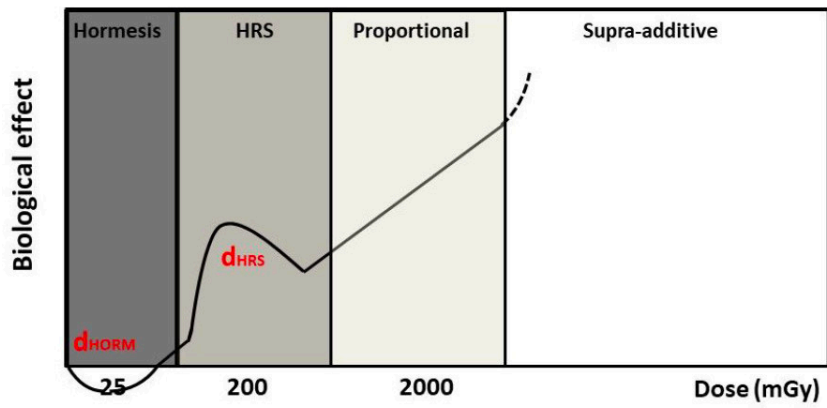


Fig. 3



SSB induced per cell:	25	200	2000	
DSB induced per cell:	<1	8	80	
Yield of active ATM monomers				
- in radioresistant cells:	Maximal	Maximal	Reduced	Insufficient
- in radiosensitive cells:	Reduced	Insufficient	Insufficient	Insufficient

Fig. 4 35

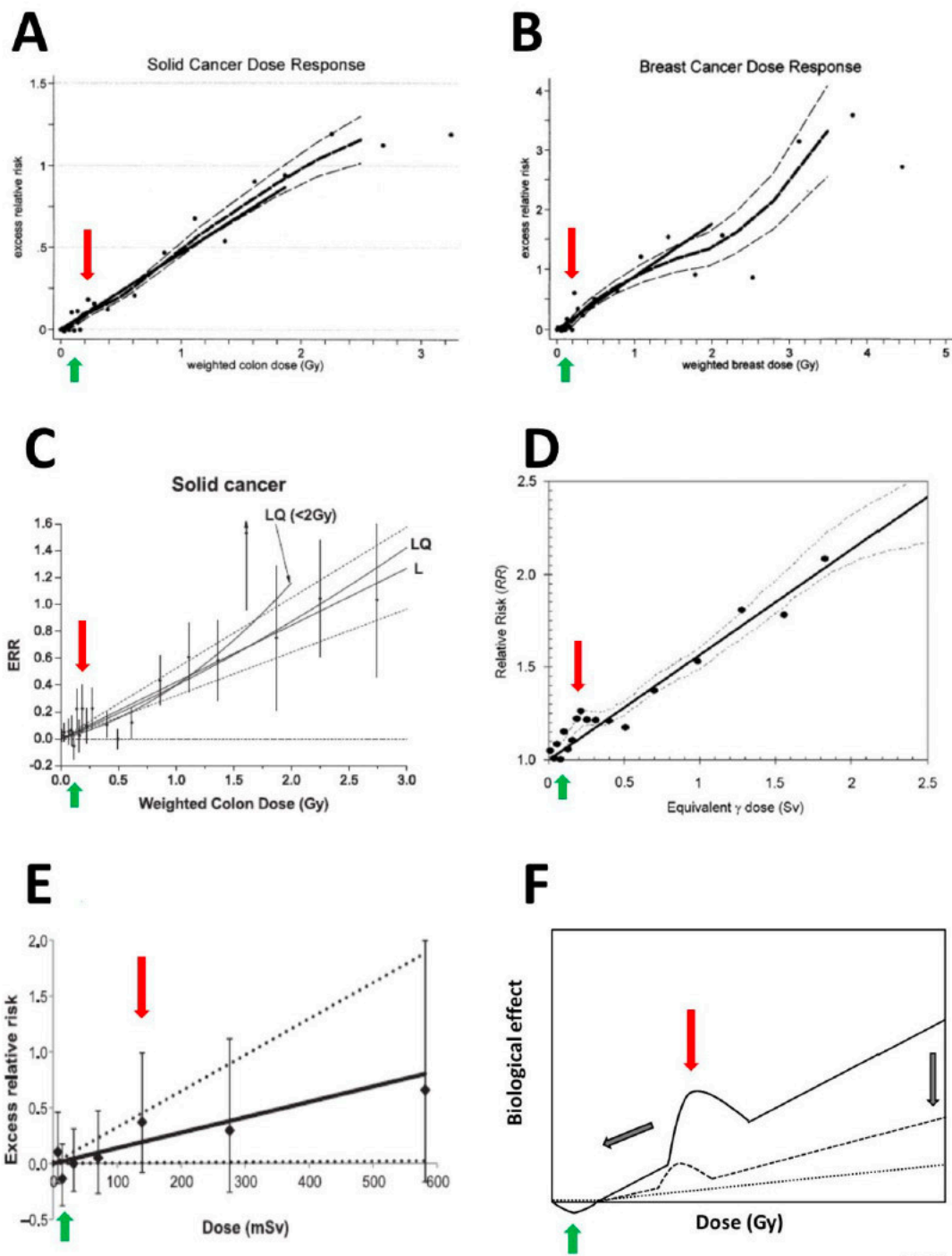
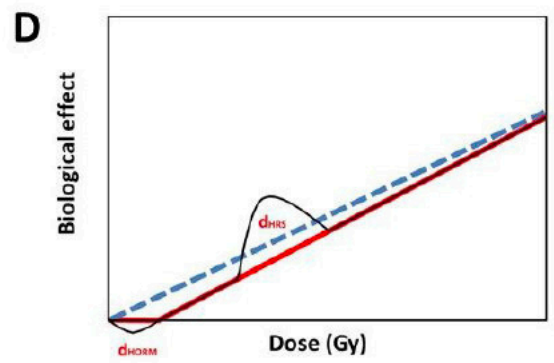
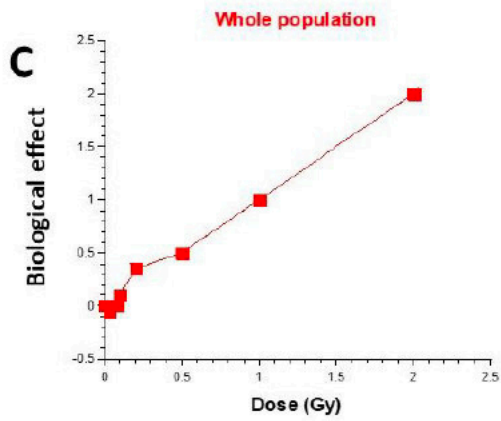
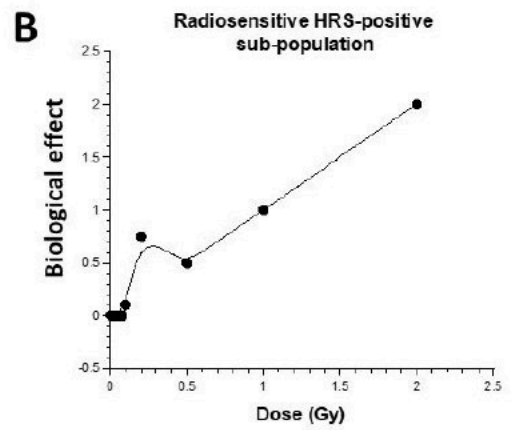
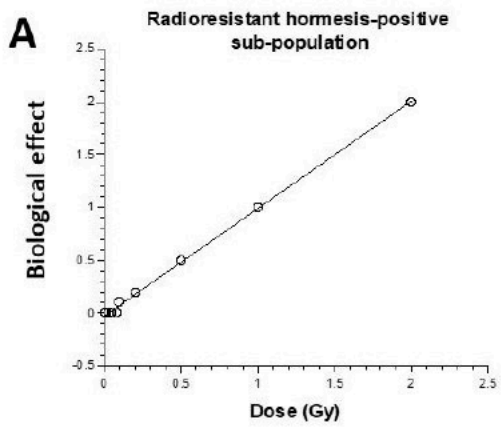


Fig. 5



#### 9.4 Influence de la radiosensibilité individuelle en radiodiagnostic : Réponse



## **biologique en scanner cérébral**

### **Influence of individual radiosensitivity in radiodiagnosis: Biological response to head CT scan exposures**

**Devic C<sup>1,2</sup>, Bodgi L<sup>2</sup>, Sonzogni L<sup>1</sup>, Banaste N<sup>3</sup>, Pilleul F<sup>3</sup>, Paul. D<sup>4</sup>, Carbillet F<sup>2</sup>, Munier M<sup>2</sup>, Foray N<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UA8 « Radiations : Défense, Santé et Environnement », Centre Léon-Bérard, 69008, Lyon, France;*

<sup>2</sup>*Société Fibermatrix., 4 Rue la Fayette, 67100 Strasbourg*

<sup>3</sup>*Centre Léon Bérard 28 rue Laennec 69008 Lyon.*

<sup>4</sup>*ALARA expertise Allée de l'Europe, 67960 Entzheim*

#Auteur pour correspondance: Dr. Nicolas Foray  
INSERM UA8 Bât Cheney A 28 Rue Laennec *Centre Léon-Bérard, 69008, Lyon, France;*

#### **Abstract**

**Background:** To investigate the impact of individual radiosensitivity and the tissue-dependence on the molecular response of human primary fibroblasts and astrocytes after exposure of a head CT scan exposure by focusing on DNA double-strand breaks (DSB) signaling and repair.

**Method:** Nine human primary fibroblasts showing a large spectrum of radiosensitivity/susceptibility and 4 primary human astrocytes from different brain localizations were exposed to a head CT scan exposure using adapted phantoms. Cells were exposed to a single helical examination (37.4 mGy) or else a two helical examination (37.4 mGy + 5 min + 37.4 mGy). Immunofluorescence against  $\gamma$ H2AX and pATM that relocalize as nuclear foci at DSB sites was applied to all irradiation conditions.

**Results:** Despite of the dose value, whether delivered as a single or double-helical CT scan, the number of recognized and/or unrepaired DSB appeared to be strongly different according to the radiosensitivity/susceptibility status of the exposed fibroblast and can correspond up to an effect 6 times higher than that expected. Similarly, astrocytes from the cortex, hippocampus, spinal cord and brain stem cells of the same donor elicited different number of  $\gamma$ H2AX and pATM foci in the two head CT scan conditions.

**Conclusions:** For a given physical dose delivered as a standard head CT scan exposure, the number of recognized and/or unrepaired DSB significantly differ among individuals, and, for a given individual, with the brain tissue region. It may be useful to integrate these findings in the discussion about the justification of the CT scan exam and the evaluation of the radiation-induced risks.

## Background

To date, radiodiagnosis procedures, notably CT scan exams, represent the largest cause of medical exposure to ionizing radiation (IR)[1,2]. For the last decade, the average annual effective dose received in the medical context has increased constantly[1,3]. These observations raise questions about the justification of diagnostic imaging and the evaluation of the risks related to medical exposure to IR[4–6]. A number of radiobiological studies have been performed to better understand and evaluate the biological consequences of CT scan exposures [7]. Particularly, since DNA damage are responsible for cellular death and radiosensitivity if unrepaired, and for cellular transformation and radiosusceptibility if misrepaired, most of research groups have investigated the number of chromosome breaks or DNA double-strand breaks (DSB) induced by CT scan exposures on circulating lymphocytes, whether in *in vitro* or *ex vivo* conditions[7]. However, the fact that the radiation-induced cancers are not necessarily limited to leukaemia [4,5] raises the question of the relevance of the choice of circulating lymphocytes to reflect the potential consequences of CT scan exams. Indeed, brain tumours and sarcomas are often cited as the most probable types of cancer potentially induced by CT scan exposure. However, while brain cells and skin fibroblasts are likely to be the most appropriate cellular models to predict the risks of such specific IR-induced cancers, respectively, no research groups have used them to assess the potential risk linked to head CT scan exposures yet. In addition to the questions of the cellular model, few studies have shown dose-effect curves or kinetics of chromosome breaks and DSB repair while dose- and time-response data provide useful information about the clinical consequences of an irradiation[8]. Lastly, there is an increasing evidence that individual factor, whether genetic or not, may significantly influence the follow-up of exposed patients and contribute to increase risks linked to exposures to IR[9,10]. However, again, few studies, if any, raise the question of the relative contribution of individual radiosensitivity in the biological response to CT scan exposures[8].

Since 2016, a unified model of the individual response to IR relevant to both high and low doses and based on the radiation-induced nucleoshuttling of the ATM protein kinase (RIANS) has been proposed[11]. In the frame of the RIANS model, IR trigger the monomerization of the ATM dimeric forms in cytoplasm. The resulting ATM monomers diffuse in nucleus and phosphorylate the H2AX histone variant molecular ( $\gamma$ H2AX) at DSB sites, which triggers the formation of nuclear  $\gamma$ H2AX foci, quantifiable by immunofluorescence. The ATM-dependent formation of  $\gamma$ H2AX foci is one of the earliest recognition step of DSB managed by the non-homologous end-joining (NHEJ), the major DSB repair pathway in humans [12–15]. During the DSB joining process, two ATM monomers reassociate on the DSB site and form the autophosphorylated ATM (pATM) foci in nuclear, also visible by immunofluorescence. The RIANS model permits to predict radiosensitivity and radiosusceptibility with one of the highest statistical robustness[11].

Here, by using 9 untransformed skin fibroblasts showing a wide spectrum of radiosensitivity and 4 untransformed astrocytes from the same donor but from different localization in the brain, the fate of DSB induced by different head CT scan exposure conditions was examined through the assessment of  $\gamma$ H2AX and pATM foci in irradiated cells.

**Methods:**

**Primary fibroblasts:** Primary fibroblasts were obtained either from the Coriell institute or from patients included in different previous projects on individual radiosensitivity in our laboratory. 100CLB is from an apparently healthy patient who undergo mammary reduction. 01HNG, 02HNA and 13HNG are three primary fibroblasts from patients who had side effects to radiotherapy and included in the Copernic project[11]. RACKHAM01, RACKHAM12 and RACKHAM39 are primary fibroblasts from 3 different Neurofibromatosis type 1 patients. GM03399, is an Ataxia-Telangiectasia heterozygote fibroblasts from Coriell Institute. 85MA is a Li-Fraumeni syndrom p53 mutated. Fibroblasts were cultivated in DMEM glutamax (31966-021 gibco) 20% SVF (10270-106 Gibco) 1% penicillin/streptomycin solution (15140-122 Gibco) and subcultured with Trypsine EDTA 0.05% (25300-054 Gibco). All primary fibroblasts were exposed at less than 20 subcultures. COPERNIC 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.

**Primary astrocytes :** Astrocytes were obtained from the Sciencell Research laboratories (1610 Faraday Ave, Carlsbad, CA 92008). HA are isolated from human brain (cerebral cortex); HA-c from human cerebellum; HA-sp from human spinal cord; HA-h from human hippocampus and HA-bs from human brain stem. Astrocytes were cultivated in appropriate medium AM (500 ml of basal medium #1801, 10 ml of fetal bovine serum (FBS, Cat. No. 0010), 5 ml of astrocyte growth supplement (AGS, Cat. No. 1852) and 5 ml of penicillin/streptomycin solution (P/S, Cat. No. 0503).

All primary astrocytes were exposed at less than 10 subcultures.

All cells were seeded 2 days before exposure and irradiated at confluence at room temperature



## **Head CT exposures**

In vitro set up in the present study was characterized by adapted phantom and standardized experimental procedure for fibroblasts and astrocytes, CT exposure, sample transport and experimental performance. An anthropomorphic head phantom was used to expose fibroblasts and a PMMA 16cm diameter Phantom was used to expose astrocytes to head CT (Fig 1)

We exposed cells on appropriated phantom in petri dishes 35x10mm (#353001 Falcon, France) and absorbed dose was measured with a dosimeter based on scintillating fiber developed by the Fibermetrix company[16,17] (fig 1). Spiral CT was performed by using a Siemens Definition EDGE Siemens healthineers (Erlange, Allemagne) operated at 166/230 mAs, 120 kV, with a 1 sec rotation time, a 0.6 pitch and with a collimation of 3 mm. CT exposures were delivered with one helical or two helicals spaced with five minutes to illustrate repeated helical series that may occur during a CT examination.

For fibroblasts phantom, these parameters provided an average volumetric CT dose indices (CTDI<sub>vol</sub>) of 29.6 mGy (SE=1.18). The average Dose-Length Products (DLPs) was 467.8 mGy·cm (ET=17.86). The average absorbed dose at the surface of the phantom was 37.4 mGy (ET=1.00) for one helical and 75.1 mGy (ET=2.31) for two helicals.

For astrocytes phantom, these parameters provided an average volumetric CT dose indices (CTDI<sub>vol</sub>) of 27.3 mGy (SE=1.99). The average Dose-Length Products (DLPs) was 441.38 mGy·cm (ET=36.48). The average absorbed dose in the phantom was 27.2 mGy (ET=2.5) for one helical and 55.9 mGy (ET=5.72) for two helicals.

**Immunofluorescence analysis**  $\gamma$ H2AX and pATM immunofluorescence protocol for assessing DSB repair and induction was described elsewhere[18,19]. Briefly, cells were fixed in paraformaldehyde for 15min at room temperature and permeabilised in detergent solution for 3 min. Primary antibody incubations were performed for 1h at 37°C Anti- $\gamma$ H2AX<sup>ser139</sup> antibody (#05-636 Merck) was used at 1:800, the monoclonal anti-mouse anti-pATM<sup>ser1981</sup> (#05-740

Merck) was used at 1:100. Incubations with anti-mouse fluorescein (FITC) secondary antibodies provided by Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau Chesnes, France) were performed at 1:100 at 37°C for 20 min. Slides were mounted in 4',6' Diamidino-2-Phenyl-indole (DAPI)-stained Vectashield (VECTOR, Lifescience) and using an X100 objective with fluorescence BX51 Olympus microscope (Olympus-France, Rungis, France). 100 nuclei were analysed for each of the three experiments. Foci scoring was performed by eye. DAPI staining permitted also the indirect evaluation of the yield of G0/G1 cells (nuclei with homogeneous DAPI staining), S cells (nuclei showing broad FITC staining without  $\gamma$ H2AX foci), G<sub>2</sub> cells and metaphases (nuclei with pre-condensed, condensed DAPI staining and visible chromosomes)[20]. Only G0/G1 cells were considered for  $\gamma$ H2AX foci scoring.

After each irradiation,  $\gamma$ H2AX were assessed at 10 min, 1h, 4h and 24 h repair times. A 10 min repair time was chosen to reflect the radio-induced DSB recognised by the non-homologous end-joining process that is the major DSB repair pathway in humans: 37 +/- 4  $\gamma$ H2AX foci per cell per Gy were observed after 10 min[19]. A 24 h post- irradiation repair time was used to assess the yield of DSB that are either unrepairable or abnormally slowly repairable; this repair time was equally chosen to avoid any technical artifact due to cell proliferation[19].

**Data Processing and Statistics:** The data and statistical analyses were processed using MATLAB R2016a (MathWorks, Natick, MA). Statistical tests were performed by grouping the 300 nuclei (100 nuclei were counted per experiment) for each cell lines and conditions. A Kolmogorov-Smirnov test was performed to test the normality of the distribution of these data in order to choose the test to apply[21]. To compare two conditions with each other, a non-parametric Mann-Whitney-Wilcoxon test was used[22,23]. When more than two conditions were compared, a Kruskal-Wallis test was performed[24]. For each of the tests, the differences were considered statistically significant when the p-value was lower than 0.05. The error bars



represent the standard deviation of the means of the three independent experiments. In the figures, the stars in the non-irradiated conditions and at 10min and 1h post-irradiation times correspond to a statistically significant difference from the radioresistant control. The stars at 24h post irradiation correspond to a statistically significant difference from the non-irradiated conditions.

## Results

### *Radiobiological effects of single- and double-helical CT scans on human fibroblasts*

Human fibroblasts derived from 9 patients showing various individual radiosensitivity were submitted to single- (37.4 mGy) or double-helical (37.4 mGy+5min+37.4 mGy) head CT scan. For each condition,  $\gamma$ H2AX and pATM foci were assessed after 10 min, 1, 4 and 24 h post-irradiation by using immunofluorescence. With regard to non-irradiated cells, the radioresistant 100CLB fibroblasts deriving from an apparently healthy patient spontaneously showed  $0.31 \pm 0.05$   $\gamma$ H2AX foci per cell. Among the other fibroblasts tested, 4 cell lines (GM03399, 85MA, 01HNG, 13HNG) showed significantly higher number of spontaneous  $\gamma$ H2AX foci ( $p < 0.001$ ) than the other cell lines tested, suggesting high genomic instability, although this number never exceeded more than one spontaneous  $\gamma$ H2AX foci per cell (Figure 2A and 2B).

Ten minutes after a single-helical CT scan exposure, the average number  $\gamma$ H2AX foci was found to be  $1.05 \pm 0.15$   $\gamma$ H2AX foci per cell in the radioresistant controls, which is slightly lower than the expected value if a  $\gamma$ H2AX foci induction rate of  $37 \pm 4$   $\gamma$ H2AX foci per Gy that would be strictly proportional to the dose was considered (1.5  $\gamma$ H2AX foci per cell was expected at 37.4 mGy) (Figure 2A). This difference with the expected value appeared even lower if spontaneous data were removed ( $0.75 \pm 0.15$   $\gamma$ H2AX foci due to radiation only) (Figure S2A). This relative lack of  $\gamma$ H2AX foci induced will be interpreted in Discussion. When  $\gamma$ H2AX foci raw data assessed at 10 min post-irradiation, 5 cell lines (RACKHAM01, RACKHAM12,

01HNG, 02HNA and 13HNG) showed a number of  $\gamma$ H2AX foci significantly lower than radioresistant controls ( $p < 0.05$ ) (Figure 2A) but when spontaneous background was removed, 7 cell lines reached the same conclusion (except RACKHAM39), suggesting a lower DSB recognition after irradiation (Figure S2A).

In the radioresistant controls, the number of  $\gamma$ H2AX foci continuously decreased with repair time in the 10 min – 24 h post-irradiation time range up to a  $\gamma$ H2AX foci data value that was not different from zero. By contrast, all the other cell lines tested obeyed different  $\gamma$ H2AX foci kinetics (Figure 2A and S2A). Particularly, the maximal number of  $\gamma$ H2AX foci was reached at different repair time and at different extent: in the GM03399, 01HNG and 13HNG cell lines, the number of radio-induced  $\gamma$ H2AX foci remained nearly constant while it reached its maximal value at 1 h post-irradiation and decreased thereafter in the other cell lines. At 24 h post-irradiation, while the number of  $\gamma$ H2AX foci remaining suggested a complete DSB repair, two major situations were encountered with the other cell lines: 1) a subset of fibroblasts showed a slow rate of foci disappearance and a number of  $\gamma$ H2AX foci remaining significantly higher than non-irradiated controls. This is the case of RACKHAM01, RACKHAM39, GM03399, 85MA, 01HNG and 13HNG cell lines; 2) another subset of fibroblasts that showed a fast rate of foci disappearance 1h post irradiation and do not show a statistically difference of  $\gamma$ H2AX foci 24h after exposure with non-exposed conditions. This is the case of RACKHAM12 and 02HNA.

When double-helical head CT scan conditions were applied to fibroblasts, the number of  $\gamma$ H2AX foci assessed 10 min post-irradiation significantly increased but not to the same extent according to the cell lines (Figure 2B+figure excess). In the radioresistant controls, the  $\gamma$ H2AX foci ratio between the double-helical and the one-helical CT scan data was found equal to 2, consistent with an additive dose-effect, when excess  $\gamma$ H2AX foci were considered. The  $\gamma$ H2AX data ratio between double-helical and one-helical CT scan conditions was lower than 2 for

RACKHAM01, RACKHAM39, 02HNA and GM03399 cells. By contrast, the same ratio was found to be much higher in 01HNG, 85MA and RACKHAM12, suggesting that the double-helical CT scan condition enhanced the recognition of radiation-induced DSB for this cell lines. Since significant biological effects are observed in cells showing more than 2  $\gamma$ H2AX foci[11], the data detailed above were examined with percentage of cells showing more than 2  $\gamma$ H2AX foci as an endpoint (Figure 2C and 2D). In agreement with the data described above, the cell lines showing more spontaneous  $\gamma$ H2AX foci are the same showing the larger number of cells with more than 2  $\gamma$ H2AX foci. After exposure to CT scan, whether with one single or double-helical CT scan, after post-irradiation time longer than 10 min, the radiosensitive/radiosusceptible patients' cell elicited larger percentage of cells showing more than 2  $\gamma$ H2AX foci.

Since ATM activity is required for the formation of  $\gamma$ H2AX foci, we have also investigated the number of nuclear pATM foci assessed in the same experimental conditions than those described above. The pATM data consolidated our conclusions with regard to both single- and double-helical CT scan conditions (figure 3 et S3).

### ***Radiobiological effects of single- and double-helical CT scans on human astrocytes***

Brain cells, and notably astrocytes, are the most natural cellular models to investigate the risks related to head CT scan exposure. However, for ethical and practical reasons, human astrocytes were very rarely used in radiobiological studies, and more particularly in the radiodiagnosis context. Here, the same head CT scan exposures conditions as those described above for fibroblasts were applied to brain astrocytes providing from the same donor. As a first step, we have focused on astrocytes from the cortex, hippocampus, spinal cord and brain stem cells.

With regard to spontaneous  $\gamma$ H2AX foci, no difference between the different astrocytic cell lines was observed: less than 0.5 spontaneous  $\gamma$ H2AX foci per cell was assessed, similarly to the radioresistant 100 CLB skin fibroblasts (Figure 4A and 4B).

Ten minutes after a single-helical CT scan exposure, the hippocampus astrocytes (HA-h) elicited 1.33 (+/- 0.13)  $\gamma$ H2AX foci per cell, which is slightly higher than the expected value if a  $\gamma$ H2AX foci induction rate of  $37 \pm 4$   $\gamma$ H2AX foci per Gy that would be strictly proportional to the dose was considered (1.08  $\gamma$ H2AX foci per cell was expected at 27.2 mGy) (Figure 4A). This difference with the expected value is non-existent if spontaneous data were removed (1.03  $\pm$  0.19  $\gamma$ H2AX foci due to radiation only) (Figure S4A).

The cortex (HA), spinal cord (HA-sp) and brain-stem (HA-bs) astrocytes showed similar  $\gamma$ H2AX foci data with less than 1  $\gamma$ H2AX foci per cell and were statistically different than HA-h ( $p < 0.001$ ) (Figure 4A). Interestingly, while the hippocampus astrocytes (HA-h) elicited a maximum DSB at 10 min post-irradiation higher than the others astrocytes, the number of  $\gamma$ H2AX foci continuously decreased with repair time to reach the lowest number of remaining  $\gamma$ H2AX foci at 24 h post-irradiation, at the same level as those reached before irradiation, suggesting that the DSB repair is complete. By contrast, all the other astrocytes showed their highest number of  $\gamma$ H2AX foci at 1 h post-irradiation. Both cortex and brain-stem astrocytes elicited a significant number of remaining foci ( $p < 0.05$ ) suggesting both incomplete DSB recognition and DSB repair. Spinal cord astrocytes showed incomplete DSB recognition but normal DSB repair rate

After a double-helical CT scan exposure, the number of  $\gamma$ H2AX foci assessed 10 min post-irradiation significantly increased similarly in all the astrocytes but, like for fibroblasts, did not correspond to the double of the number of  $\gamma$ H2AX foci obtained after a single-helical CT scan (Figure 4B). In other terms, the  $\gamma$ H2AX foci ratio between the double-helical and the one-helical CT scan data was found lower than 2, suggesting an infra-additive effect for all the astrocytes

tested. Interestingly, in double-helical CT scan exposure, all the astrocytes showed a maximal number of  $\gamma$ H2AX foci reached at 1 h instead of 10 min post-irradiation, suggesting that the DSB recognition is not complete early after irradiation.

Like for fibroblasts, we assessed the percentages of cells with more than 2 foci  $\gamma$ H2AX (Figure 4C and 4D), and the number of pATM foci in the same experimental conditions (Figure 5A and 5B): the conclusions reached with these two parameters were similar than those suggested by the data described above.

## Discussion

There is a number of radiobiological studies aiming to evaluate the radiation-induced risks related to CT scan exposures. The great majority of them have involved lymphocytes[7]. Here, for the first time to our knowledge, fibroblasts from patients with different radiosensitivity/radiosusceptibility and astrocytes from the same donor but from different brain's location were exposed to one- and double-helical head CT scan sessions. Our findings suggest that individual factor in skin fibroblasts and brain region origin with astrocytes may elicit different biological responses when  $\gamma$ H2AX and pATM foci are taken as endpoints. Since these two biomarkers reflect the functionality of DSB recognition and repair, our data provide clues that, even for one-helical CT scan exposures (corresponding here to 37.4 mGy), the biological dose can be different from the physical one. One of the most representative examples of this difference is the number of residual  $\gamma$ H2AX assessed 24 h post-irradiation that may be 2-3 times higher in cells of patients suffering from syndromes associated with radiosensitivity or radiosusceptibility than controls. These findings strongly suggest that physical dose is not sufficient alone to reflect the risks related to CT scan exposures.

In the frame of the RIANS model, these findings are in agreement with previous studies as follows: low dose exposure to radiation induce a low number of DSB in nucleus. Consequently, and particularly for the radiosensitivity and/or radiosusceptibility patients, few ATM monomers diffuse in nucleus and some DSB may be unrecognized. In this study, fibroblast cell lines held  $p53^{+/-}$  mutations (85MA cell line; Li-Fraumeni syndrome, absence of significant radiosensitivity but high radiosusceptibility),  $ATM^{+/-}$  mutations (GM03399 cell line; parents from ataxia telangiectasia patients; absence of significant radiosensitivity but high radiosusceptibility),  $NFI^{+/-}$  mutations (RACKHAM cell lines; neurofibromatosis type 1; no or

moderate radiosensitivity and high radiosusceptibility). Furthermore, 3 fibroblast cell lines derived from patients who showed grade 1-4 radiosensitivity during or after their anti-cancer radiotherapy (01HNG, 02HNA, 13HNG) were used in this study, as well. All these cell lines systematically showed delay of RIANS after 2 Gy X-rays : they belong to the group II of radiosensitivity defined elsewhere[11,25]. We have already showed that group II cells also elicit the hypersensitivity to low doses (HRS) phenomenon that is due to the lack of DSB recognition[26]. Interestingly, the optimal dose range to observe an HRS phenomenon with the dose-rate applied in head CT scan (100 mGy/min) was determined to be [10-50 mGy][27] which is in very good agreement with the present data. Hence, the lower  $\gamma$ H2AX foci values assessed at 10 min post-irradiation in group II fibroblasts are very consistent with the RIANS model that explains these data via a lack of ATM monomers in nucleus to phosphorylate  $\gamma$ H2AX and recognized DSB. Besides, this hypothesis is consolidated by the fact that the maximal number of  $\gamma$ H2AX foci were observed at 1h rather than 10 min post-irradiation. Interestingly, the dose of 37.4 mGy for a single-helical brain CT scan may be also low for radioresistant cells and explain why the number of  $\gamma$ H2AX foci was found lower than expected in controls, as well. But it must be stressed here that the value of 37 (+/-4)  $\gamma$ H2AX foci per Gy is an extrapolation of High doses data and this ratio may not be the same for low doses. While group II cells are all characterized by a higher lack of DSB recognition, we observed higher numbers of  $\gamma$ H2AX foci at 24 h post-irradiation, suggesting an incomplete DSB repair, in a subset of cell lines only. In this frame, both numbers of  $\gamma$ H2AX foci assessed at 10 min and 24 h post-irradiation may therefore serve as indicators of radiosensitivity/radiosusceptibility, as already suggested[28]. However, it must be stressed here than the doses applied during CT scans are not high enough to trigger a significant tissue reaction (radiosensitivity). This last statement raises two questions: what is the fate of cells that hold unrepaired DSB after a CT scan exposure? How to quantify the risk of cancers potential induced by CT scan exposures?

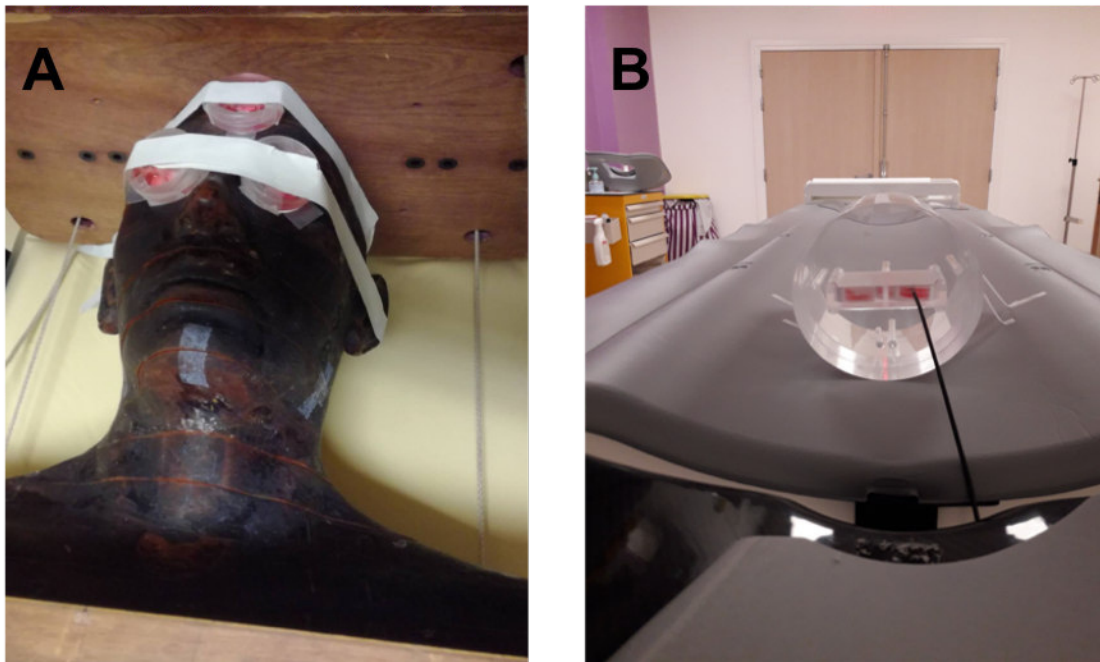
When the  $\gamma$ H2AX foci data assessed 24 h post-irradiation are considered, it is noteworthy that, even after two-helical CT scans, the number of radio-induced  $\gamma$ H2AX foci remaining does not exceed 1 and therefore represents a sublethal rather than a lethal level of DSB remaining. The competition between DSB misrepair and incomplete DSB repair may strongly depend on the level of radiosensitivity and the level of radiosusceptibility of each cell line. Furthermore, if misrepaired and non-repaired DSB are accumulated and therefore tolerated through CT scan repeated sessions, one should also consider the aging effect that can produce several DNA strand breaks in nucleus. Further investigations are therefore needed to better quantify the risk of each of the clinical consequences of an exposure to IR, namely radiosensitivity, radiosusceptibility and accelerated aging (radiodegeneration) and at what thresholds they can become significant.

## **Conclusion**

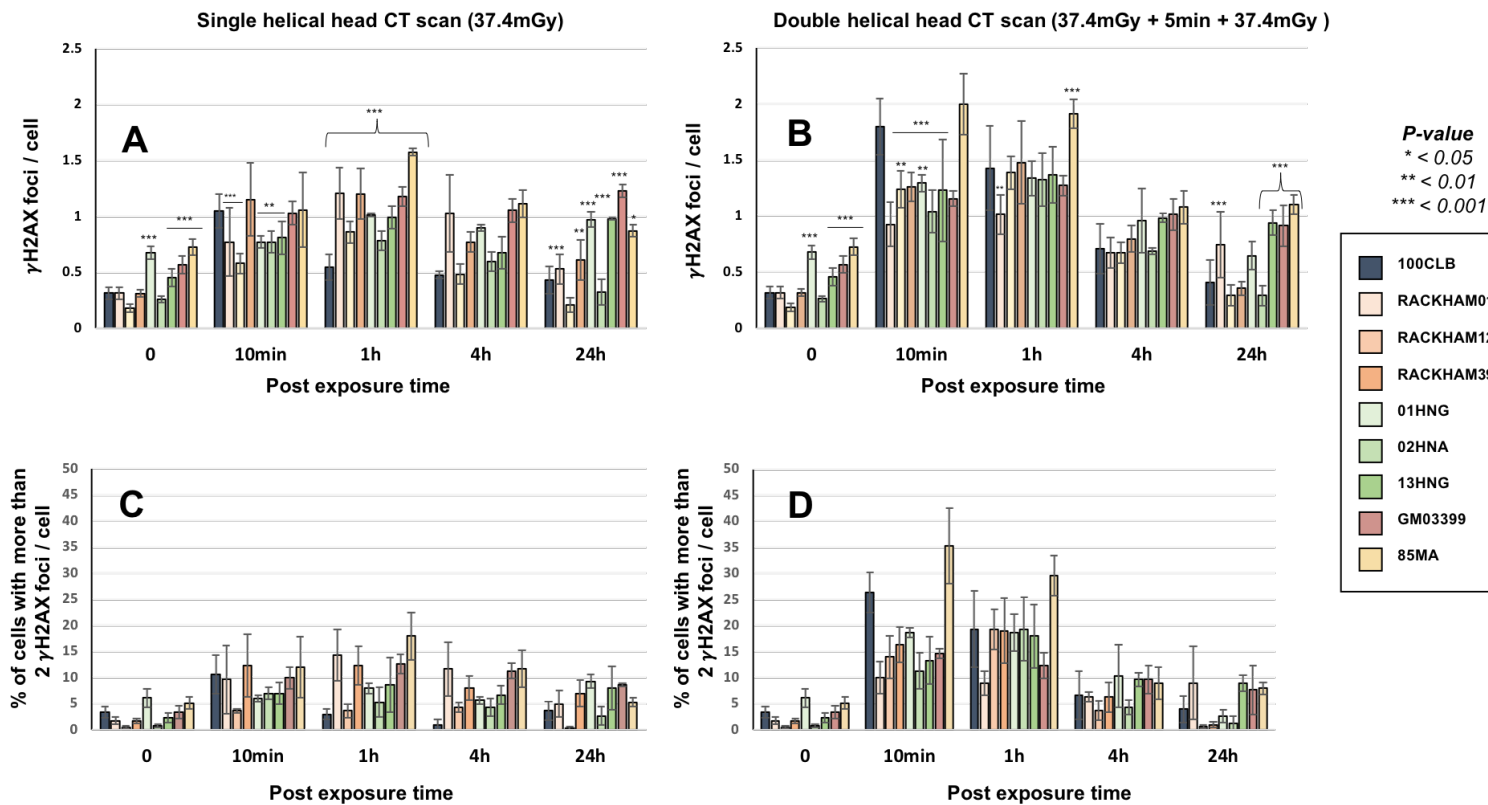
it must be stressed here that the absence of biomarker specific to radiosusceptibility is one of the major limitations of the studies aiming to evaluate the potential risk of CT scan exposure. Even if DSB misrepair, hyperrecombination and genomic instability are systematically associated with cancer proneness, a reliable biomarker that would be applicable in CT scan conditions is required. Nevertheless, it is noteworthy that if, for a given physical dose, the number of recognized and/or residual DSB significantly differ from a patient to another, it should be sufficient to integrate these findings in the discussion about the justification of the CT scan exam. Obviously, again, a number of additional studies are needed to quantify the risk for a given genetic status. However, our data presented here provides new clues that, even for low-dose exposure applied in CT scan exams, the cells from some patients may show very different biological response to IR.



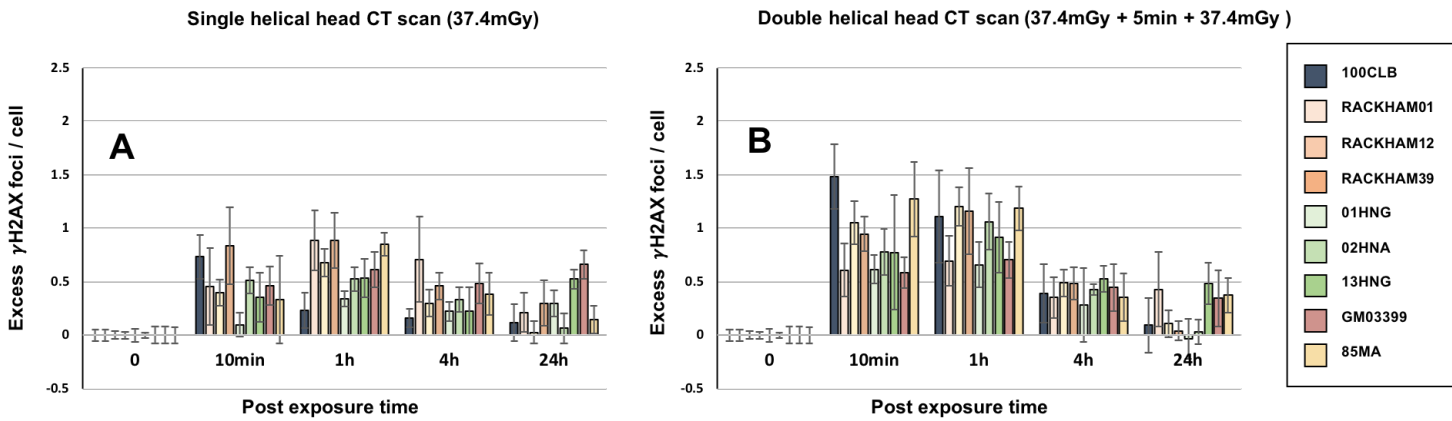
## Figures



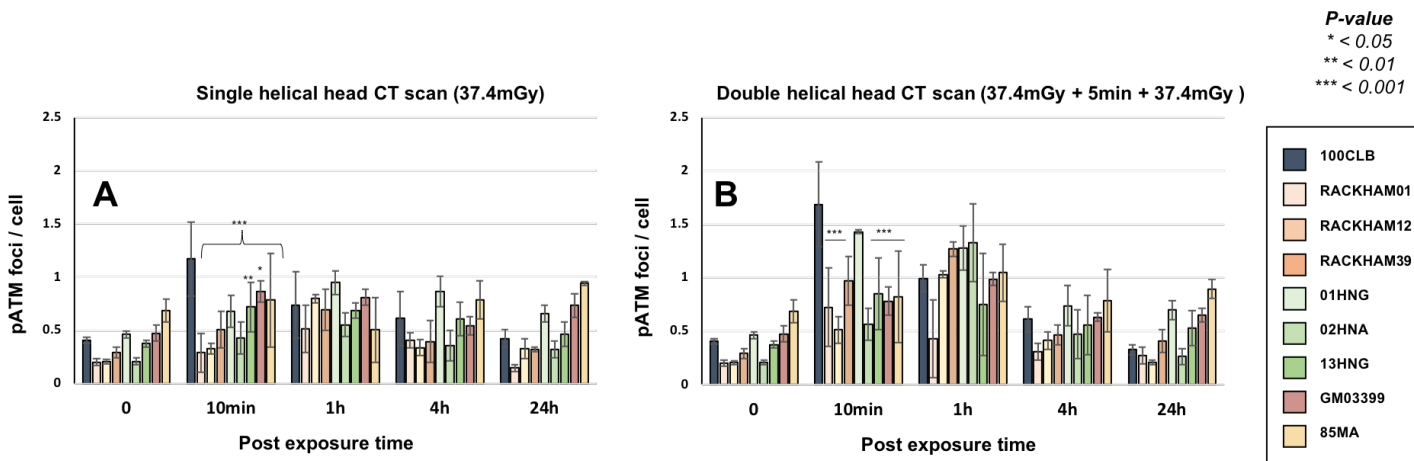
**Figure 1** : Head CT scan cells exposures set-up. Anthropomorphic fibroblasts phantom **(A)** 16cm diameter PMMA Astrocytes phantom **(B)** Astrocytes were placed in the centrum of the phantom in order to take into account the x-rays attenuation



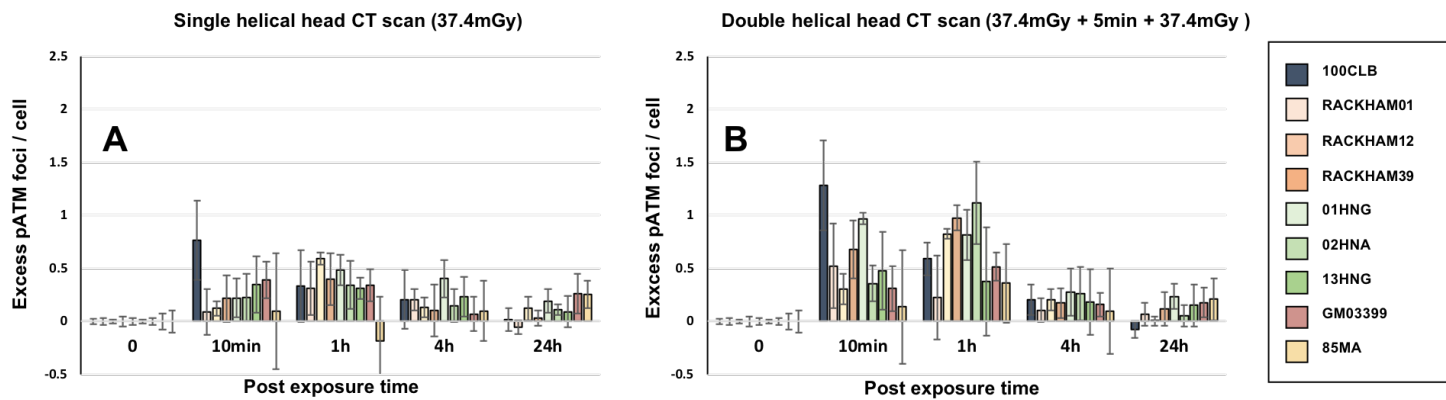
**Figure 2.** Kinetics for  $\gamma$ H2AX foci loss in fibroblasts after a single helical head CT scan (**A**), or a double-helical head CT scan (**B**) at the indicated times after CT ( $t_0$  = non irradiated). (Lower) Data shows the mean number of cells with more than 2 foci after a single helical head CT scan (**C**), or a double-helical head CT scan (**D**) at the indicated times after CT ( $t_0$  = non irradiated). Error bars indicate SEM of the 3 experiments. \* stars in the non-irradiated conditions and at 10min and 1h post-irradiation times correspond to a statistically significant difference from the radioresistant control. The stars at 24h post irradiation correspond to a statistically significant difference from the non-irradiated conditions.



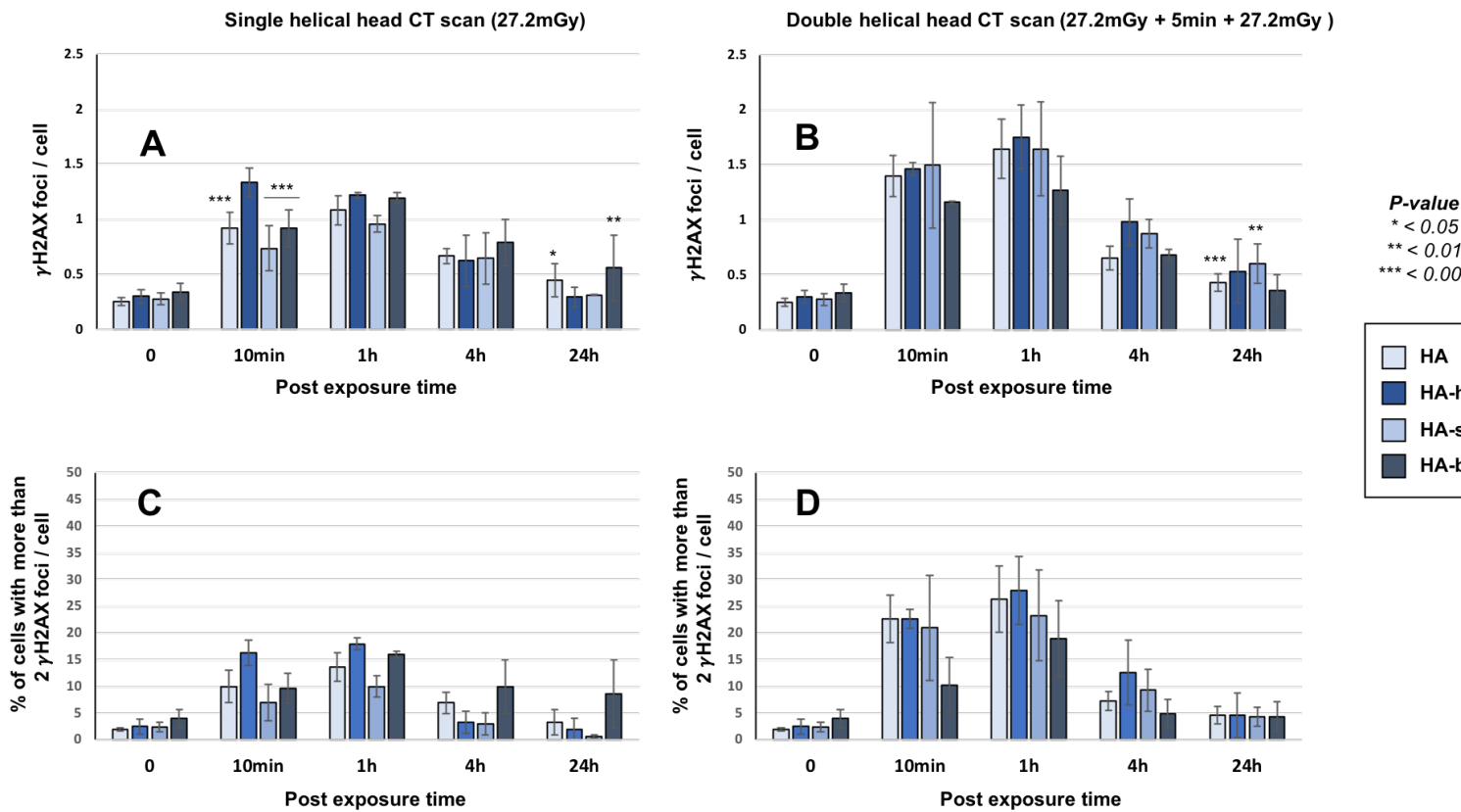
**Figure. S2.** Kinetics for excess  $\gamma$ H2AX foci loss in fibroblasts after a single helical head CT scan (A), or a double-helical head CT scan (B) at the indicated times after CT ( $t_0$  = non-irradiated). Data were derived by background subtraction for each individual. Error bars indicate SEM of the 3 experiments.



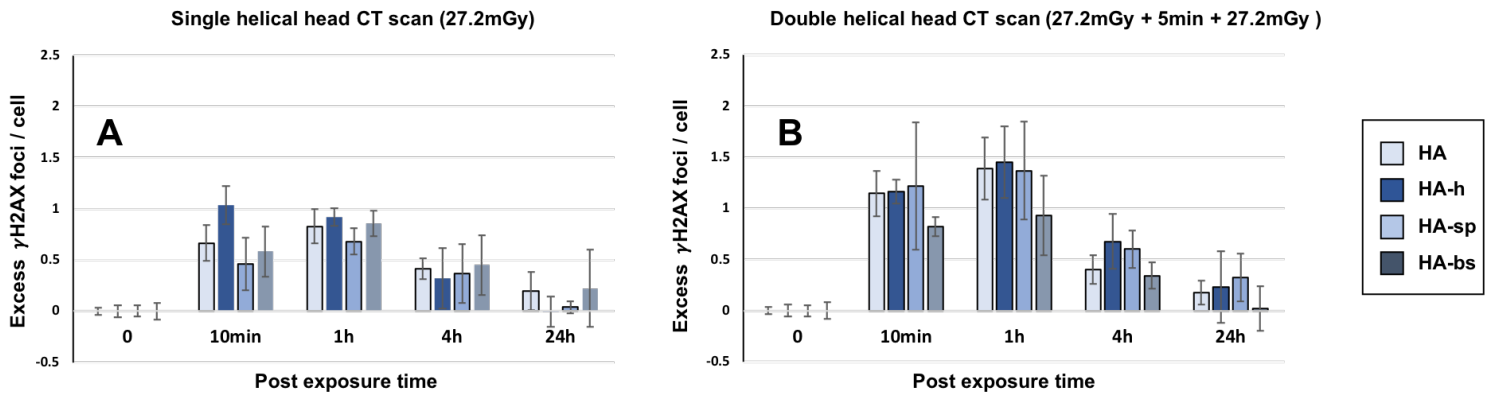
**Figure. 3.** Kinetics for pATM foci loss in fibroblasts after a single helical head CT scan (A), or a double-helical head CT scan (B) at the indicated times after CT ( $t_0$  = non irradiated). Error bars indicate SEM of the 3 experiments. \*stars at 10min post-irradiation times correspond to a statistically significant difference from the radioresistant control.



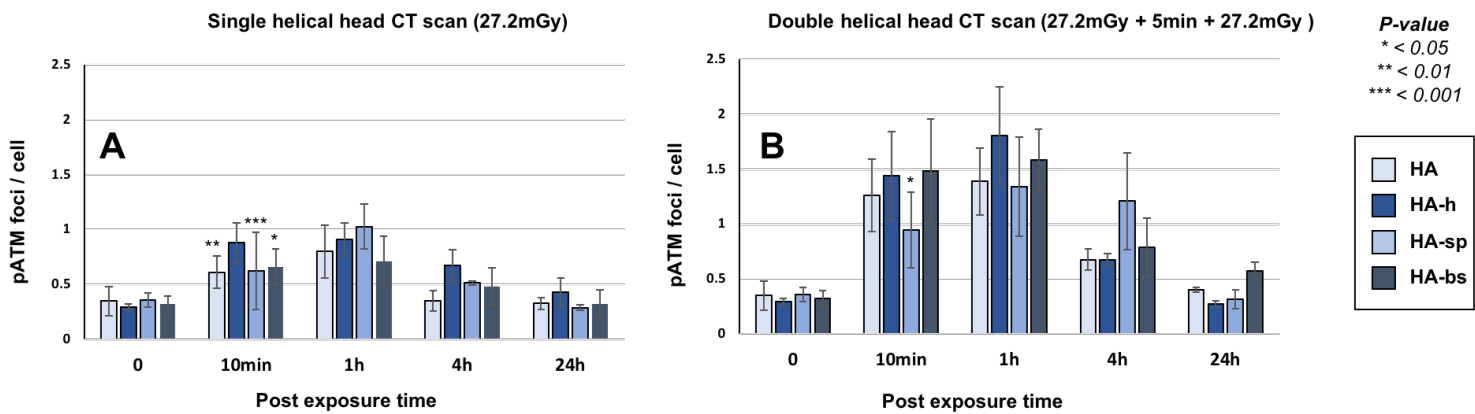
**Figure S3 :** Kinetics for excess pATM foci loss in fibroblasts after a single helical head CT scan (A), or a double-helical head CT scan (B) at the indicated times after CT ( $t_0$  = non irradiated). Data were derived by background subtraction for each individual. Error bars indicate SEM of the 3 experiments.



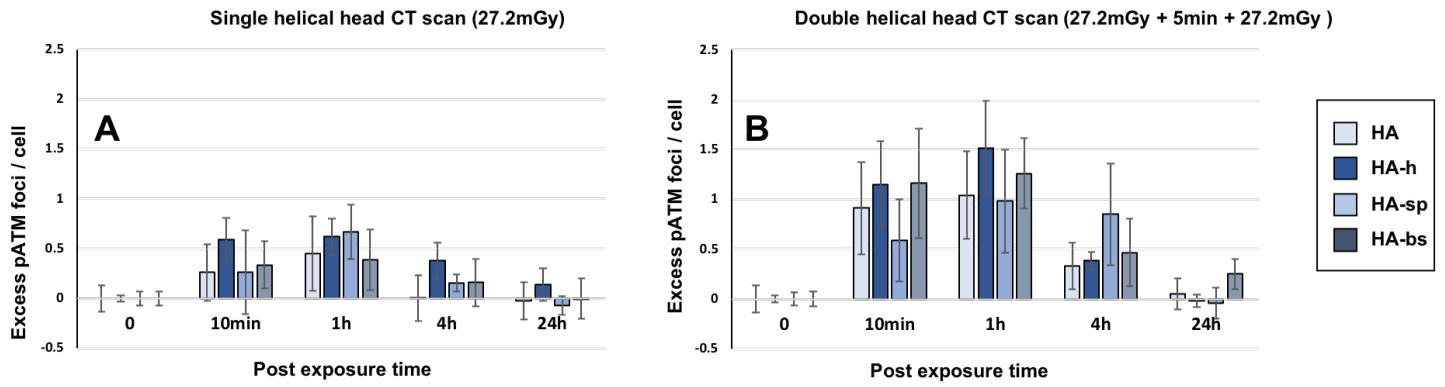
**Figure 4.** Kinetics for  $\gamma$ H2AX foci loss in Astrocytes after a single helical head CT scan (**A**), or a double-helical head CT scan (**B**) at the indicated times after CT ( $t_0$  = non irradiated). (*Lower*) Data shows the mean number of cells which had 2 or more foci after a single helical head CT scan (**C**), or a double-helical head CT scan (**D**) at the indicated times after CT ( $t_0$  = non irradiated). Error bars indicate SEM of the 3 experiments. \*stars in the non-irradiated conditions and at 10min and 1h post-irradiation times correspond to a statistically significant difference from the radioresistant control. The stars at 24h post irradiation correspond to a statistically significant difference from the non-irradiated conditions.



**Figure. S4.** Kinetics for excess  $\gamma$ H2AX foci loss in astrocytes after a single helical head CT scan (**A**), or a double-helical head CT scan (**B**) at the indicated times after CT ( $t_0$  = non-irradiated). Data were derived by background subtraction for each individual. Error bars indicate SEM of the 3 experiments.



**Figure. 5.** Kinetics for pATM foci loss in astrocytes after a single helical head CT scan (**A**), or a double-helical head CT scan (**B**) at the indicated times after CT ( $t_0$  = non irradiated). Error bars indicate SEM of the 3 experiments. \*stars at 10min post-irradiation times correspond to a statistically significant difference between astrocytes cell lines.



**Figure. S5.** Kinetics for excess pATM foci loss in astrocytes after a single helical head CT scan **(A)**, or a double-helical head CT scan **(B)** at the indicated times after CT ( $t_0$  = non-irradiated). Data were derived by background subtraction for each individual. Error bars indicate SEM of the 3 experiments.

1. National Council on Radiation Protection and Measurements. Ionizing Radiation Exposure of the Population of the United States. *NCRP Rep 160* 2009.
2. Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire. Exposition de la population française aux rayonnements ionisants liée aux actes de diagnostic médical en 2012. 2012;**PRP-HOM**.
3. Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire. *Exposition de La Population Française Aux Rayonnements Ionisants Rapport IRSN/2015-00001*., 2015.
4. Pearce MS, Salotti JA, Little MP *et al*. Radiation exposure from CT scans in childhood and subsequent risk of leukaemia and brain tumours: A retrospective cohort study. *Lancet* 2012;**380**:499–505.
5. Mathews JD, Forsythe A V, Brady Z *et al*. Cancer risk in 680,000 people exposed to computed tomography scans in childhood or adolescence: data linkage study of 11 million Australians. *Bmj* 2013;**346**:f2360.
6. Bouëtté A, Karoussou-Schreiner A, Ducou Le Pointe H *et al*. National audit on the appropriateness of CT and MRI examinations in Luxembourg. *Insights Imaging* 2019;**10**, DOI: 10.1186/s13244-019-0731-9.
7. Shi L, Tashiro S. Estimation of the effects of medical diagnostic radiation exposure based on DNA damage. *J Radiat Res* 2018;**59**:ii121–9.
8. Lobrich M, Rief N, Kuhne M *et al*. In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations. *Proc Natl Acad Sci* 2005;**102**:8984–9.
9. Bourguignon M, Bérard P, Bertho JM *et al*. What's next in Radioprotection ? . *Radioprotection* 2017;**52**:21–8.
10. Foray N, Colin C, Bourguignon M. 100 Years of Individual Radiosensitivity: How We Have Forgotten the Evidence. *Radiology* 2012;**264**:627–31.
11. Granzotto A, Benadjaoud MA, Vogin G *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**:450–60.
12. Rothkamm K, Lobrich M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *PNAS* 2003;**100**:1–6.
13. Kastan M, Bakkenist C. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimmer association. *Nature* 2003;**421**:499–506.
14. Burma S, Chen B, Murphy M *et al*. Atm phosphorylates histone h2ax in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 2001;276:42462-42467.
15. Rogakou E, Pilch D, Orr A *et al*. DNA double-stranded breaks induce histone h2ax phosphorylation on



serine 139. *J Biol Chem* 1998;273:5858-5868.

16. Munier M, Sohier T, Jung J *et al.* Procédé de détermination de la dose d'irradiation déposée dans un scintillateur par un rayonnement ionisant et dispositif associé. *FR2981757(B1)* ; date priorité 24/10/2011; délivrance 04042014 Bull 14/14.

17. Munier M, Sohier T, Jung J *et al.* Method for determining the irradiation dose deposited in a scintillator by ionising radiation and associated device. *WO2013060745(A1)*, date priorité 24/10/2011, *Publ Int 02052013* ; *US9244178(B2)*, délivrance 26012016.

18. Foray N, Marot D, Gabriel A *et al.* A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *EMBO J* 2003;22:2860–71.

19. Joubert A, Zimmerman 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.

20. Thomas C, Charrier J, Massart C *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;84:533-548.

21. Massey F. The Kolmogorov-Smirnov Test for Goodness of Fit. *J Am Stat Assoc* 1951;46(253):68–78.

22. Mann H, Whitney D. On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *Ann Math Stat* 1947;18(1):50–60.

23. Wilcoxon F. Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biometrics Bull* 1945;1(6):80–3.

24. Kruskal W, Wallis W. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *J Am Stat Assoc* 1952;47(260):583–621.

25. Bencokova Z, Devic C, Ferlazzo M. *et al.* In Press : Radiobiological characterization of neurofibromatosis type I: the neurofibromin protein impacts on the ATM-dependent DNA damage repair and signaling pathway. *Mol Neurobiol* 2019.

26. Devic C, Bodgi L, Granzotto A *et al.* Le phénomène d'hypersensibilité aux faibles doses : Une énigme de la radiobiologie enfin résolue ? *Med Nucl* 2016, DOI: 10.1016/j.mednuc.2016.02.010.

27. Thomas C, Martin J, Devic C *et al.* Impact of dose-rate on the low-dose hyper-radiosensitivity and induced radioresistance (HRS/IRR) response. *Int J Radiat Biol* 2013;89, DOI: 10.3109/09553002.2013.800248.

28. Berthel E, Foray N, Ferlazzo ML. The Nucleoshuttling of the ATM Protein: A Unified Model to Describe the Individual Response to High- and Low-Dose of Radiation? *Cancers (Basel)* 2019;11:905.



## **9.5 Influence de la radiosensibilité individuelle en radiodiagnostic : Réponse biologique en scanner thoracique**

### **Influence of individual radiosensitivity in radiodiagnosis: Biological response to chest CT scan exposures**

**Devic C<sup>1,2</sup>, Bodgi L<sup>2</sup>, Sonzogni L<sup>1</sup>, Banaste N<sup>3</sup>, Pilleul F<sup>3</sup>, Paul D<sup>4</sup>, Carbillet F<sup>2</sup>, Munier M<sup>2</sup>, Foray N<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UA8 « Radiations : Défense, Santé et Environnement », Centre Léon-Bérard, 69008, Lyon, France;*

*<sup>2</sup>Société Fibermatrix,, 7 Allée de l'Europe, 67960 Entzheim*

*<sup>3</sup>Centre Léon Bérard 28 rue Laennec 69008 Lyon.*

*<sup>4</sup>ALARA expertise Allée de l'Europe, 67960 Entzheim*

#Auteur pour correspondance: Dr. Nicolas Foray  
INSERM UA8 Bât Cheney A 28 Rue Laennec Centre Léon-Bérard, 69008, Lyon, France;

## **Abstract**

**Background:** To investigate the impact of individual radiosensitivity and the tissue-dependence on the molecular response of human primary fibroblasts and mammary epithelial cells after a chest CT scan exposure by focusing on DNA double-strand breaks (DSB) signaling and repair.

**Method:** Twelve human primary fibroblasts showing a large spectrum of radiosensitivity/susceptibility and 4 primary human mammary epithelial cells from different patients to a standard chest CT scan exposure using adapted phantoms. Cells were exposed to a single helical examination (14.4 mGy) or else a topogram followed by one single helical examination (1.1 mGy + 1 min + 14.4 mGy). Immunofluorescence against  $\gamma$ H2AX and pATM that relocate as nuclear foci at DSB sites was applied to all irradiation conditions.

**Results:** Whether delivered with a topogram or not, a single or double-helical chest CT scan, resulted in a significant number of DSB whose recognition and repair strongly differ from the radiosensitivity/susceptibility status of the exposed fibroblast. Furthermore, highly damaged cells (HDC) may be observed in cells providing from patients suffering from cancer proneness. Lastly, mammary epithelial cells elicited less recognized but more unrepaired DSB different than their fibroblast counterparts.

**Conclusions:** Even in the case of a standard chest CT scan exam, the radiation response may be exacerbated by the presence of some gene mutations responsible for radiosensitivity and/or radiosusceptibility. Our findings suggest that individual factor should be taken into account for better evaluating the radiation-induced risks potentially linked to chest CT scan exam.

## Background

Ionizing radiation (IR) induce DNA double-strand breaks (DSB) that are suggested to be linked to cellular death, tissue reactions and radiosensitivity if unrepaired, and to cellular transformation, IR-induced cancers and radiosusceptibility if misrepaired[1]. Nevertheless, while the quantitative correlations between unrepaired DSB and cellular radiosensitivity are very documented at high doses, there is still no consensual link between IR-induced cancers and biomarkers reflecting DNA misrepair. A precise quantification of the risk of IR-induced cancer is however a societal, medical and scientific issue. To this aim, our lab established a systematic routine to investigate the functionality of the DSB signaling and repair based on the assesment of the nucleo-shuttling of the ATM protein, a major actor of molecular response to radiation[1].

To date, CT scan exams, represent the largest cause of medical exposure to IR with doses ranging from 10 to 80 mGy delivered at about 100 mGy/min. Extensive biological dosimetry is required to help clinicians in justifying a safe use of diagnostic imaging [2,3]. While a number of radiobiological studies have been performed to identify the long-term biological consequences of CT scan exposures [4], the great majority of them involved circulating lymphocytes, whether in *in vitro* or *ex vivo* conditions, which limits their impact in predicting other radiation-induced cancers than leukaemia [4]. For example, mammary epithelial cells are likely to be the most appropriate cellular models to predict the risks of IR-induced breast tumours. Furthermore, some specific breast tumor suppressor genes, like BRCA1 and BRCA2 have been identified and the heterozygous mutations of these genes have been associated with a significant risk of breast cancer [5–7]. However, again, few studies, if any, has raised the question of the relative contribution of individual radiosusceptibility in the biological response to CT scan exposures[8].

Here, by using 12 untransformed skin fibroblasts from various radiosensitivity and 4 untransformed mammary epithelial cells from 4 different patients, the fate of DSB induced by chest CT scan exposure with or without topogram was examined by applying immunofluorescence of  $\gamma$ H2AX and pATM, two major markers of the DSB repair and signaling pathways. In parallel to this biological dosimetry, the dose delivered in each condition was carried with a new generation optical scintillating fiber dosimeter.

### **Methods :**

**Primary fibroblasts :** Primary fibroblasts were obtained either from the Coriell institute or from patients included in different previous projects on individual radiosensitivity in our laboratory. 100CLB is from an apparently healthy patient who undergo mammary reduction. 01HNG, 02HNA and 13HNG are three primary fibroblasts from patients who had side effects to radiotherapy and included in the Copernic project[1]. RACKHAM01, RACKHAM12 and RACKHAM39 are primary fibroblasts from 3 different Neurofibromatosis type 1 patients. GM03399, is an Ataxia-Telangiectasia heterozygote fibroblasts from Coriell Institute. 85MA is a Li-Fraumeni syndrom p53 mutated. 101CLB, 102CLB and 103CLB are from patient BRCA2 mutated (101CLB) or BRCA1 mutated (102CLB and 103CLB) who undergo prophylactic mastectomy.

Fibroblasts were cultivated in DMEM glutamax (31966-021 gibco) 20% SVF (10270-106 Gibco) 1% penicillin/streptomycin solution (15140-122 Gibco) and subcultured with Trypsine EDTA 0.05% (25300-054 Gibco). All primary fibroblasts were exposed at less than 20 subcultures. COPERNIC 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.

**Mammary épithéliales cells :** From biopsy samples of the same patients of 100CLB, 101CLB, 102CLB and 103CLB, primary mammary epithelial cells were routinely cultured as monolayers with specific mammary epithelial cell medium provided by Sciencell Research Laboratories (MEpiCM medium; Clinisciences, Montrouge, France) supplemented with the specific growth factor complement MEpiCGS (Clinisciences), penicillin and streptomycin but not fungicide agents. To confirm the epithelial nature of cultured cells, immunofluorescence staining using antibody against cytokeratin 18 (ab668 Mouse monoclonal CK18 (C-04) dilution 1:100; Abcam SAS, Cambridge, England) was performed (Fig 1)[9].

Experiments were performed with cells at early passages (1 to 4) and at a plateau phase of growth to avoid any bias generated by cell cycle. However, the low number of primary cells of primary epithelial cells available obliged us to make some drastic choice: we deliberately chose not to apply systematically flow cytometry analysis. To compensate this lack of cytometry data, cells were systematically seeded at very high-density (1,000,000 cells per 6-cm Petri dishes) and visible light and immunofluorescence microscopy images clearly showed uniform monolayers with less than 3% cells in G2/M phase (controlled by eye, immunofluorescence) during all the kinetic. These last observations suggest that replication was negligible 24 h after irradiation under our cell culture conditions.

All cells were seeded 2 days before exposure and irradiated at confluence at room temperature

### **Chest CT exposure**

In vitro set up in the present study was characterized by adapted phantom and standardized experimental procedure for fibroblasts and astrocytes, CT exposure, sample transport and

experimental performance. PMMA 32cm diameter Phantom was used to expose astrocytes to head CT (Fig 2)

We exposed cells on appropriated phantom in petri dishes 35x10mm (#353001 Falcon, France) and absorbed dose was measured with a dosimeter based on scintillating fiber developed by the Fibermetrix company[10,11] (fig 2). Spiral CT was performed by using a Siemens Definition EDGE Siemens healthineers (Erlange, Allemagne) operated at 202/106 mAs (Topogram at 35mA), 100 kV, with a 0.33sec rotation time, a 1.2 pitch and with a collimation of 1.5mm. These parameters provided an average volumetric CT dose indices (CTDI<sub>vol</sub>) of 8.1 mGy (SE=0.6). The average Dose-Length Products (DLPs) was 136.1 mGy·cm (ET=11.9). The average absorbed dose at the surface of the phantom was 14.4 mGy (ET=1.91). Concerning the topogram, volumetric CT dose indices (CTDI<sub>vol</sub>) was 0.13 mGy (SE=0.01). The average Dose-Length Products (DLPs) was 6.7 mGy·cm (ET=0.64). The average absorbed dose at the surface of the phantom was 1.1 mGy (ET=0.06).

**Immunofluorescence analysis**  $\gamma$ H2AX and pATM immunofluorescence protocol for assessing DSB repair and induction was described elsewhere[12,13]. Briefly, cells were fixed in paraformaldehyde for 15min at room temperature and permeabilised in detergent solution for 3 min. Primary antibody incubations were performed for 1h at 37°C Anti- $\gamma$ H2AX<sup>ser139</sup> antibody (#05-636 Merck) was used at 1:800, the monoclonal anti-mouse anti-pATM<sup>ser1981</sup> (#05-740 Merck) was used at 1:100. Incubations with anti-mouse fluorescein (FITC) secondary antibodies provided by Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau Chesnes, France) were performed at 1:100 at 37°C for 20 min. Slides were mounted in 4',6' Diamidino-2-Phenyl-indole (DAPI)-stained Vectashield (VECTOR, Lifescience) and using an X100 objective with fluorescence BX51 Olympus microscope (Olympus-France, Rungis, France). 100 nuclei were analysed for each of the three experiments. Foci scoring was performed by eye. DAPI staining permitted



also the indirect evaluation of the yield of G0/G1 cells (nuclei with homogeneous DAPI staining), S cells (nuclei showing broad FITC staining without  $\gamma$ H2AX foci), G<sub>2</sub> cells and metaphases (nuclei with pre-condensed, condensed DAPI staining and visible chromosomes)[14]. Only G0/G1 cells were considered for  $\gamma$ H2AX foci scoring.

After each irradiation,  $\gamma$ H2AX were assessed at 10 min, 1h, 4h and 24 h repair times. A 10 min repair time was chosen to reflect the radio-induced DSB recognised by the non-homologous end-joining process that is the major DSB repair pathway in humans: 37 +/- 4  $\gamma$ H2AX foci per cell per Gy were observed after 10 min[13]. A 24 h post- irradiation repair time was used to assess the yield of DSB that are either unreparable or abnormally slowly repairable; this repair time was equally chosen to avoid any technical artifact due to cell proliferation[13].

**Data Processing and Statistics:** The data and statistical analyses were processed using MATLAB R2016a (MathWorks, Natick, MA). Statistical tests were performed by grouping the 300 nuclei (100 nuclei were counted per experiment) for each cell lines and conditions. A Kolmogorov-Smirnov test was performed to test the normality of the distribution of these data in order to choose the test to apply[15]. To compare two conditions with each other, a non-parametric Mann-Whitney-Wilcoxon test was used[16,17]. When more than two conditions were compared, a Kruskal-Wallis test was performed[18]. For each of the tests, the differences were considered statistically significant when the p-value was lower than 0.05. The error bars represent the standard deviation of the means of the three independent experiments. In the figures, the stars in the non-irradiated conditions and at 10min and 1h post-irradiation times correspond to a statistically significant difference from the radioresistant control. The stars at 24h post irradiation correspond to a statistically significant difference from the non-irradiated conditions.

## Results

### *Radiobiological effects of single chest CT scan on human fibroblasts*

Human fibroblasts derived from 12 patients showing various individual radiosensitivity were submitted to single- (14.4 mGy) chest CT scan. For each condition,  $\gamma$ H2AX and pATM foci were assessed after 10 min, 1, 4 and 24 h post-irradiation by using immunofluorescence. With regard to non-irradiated cells, while the radioresistant 100CLB fibroblast controls showed  $0.31 \pm 0.05$   $\gamma$ H2AX foci per cell, 7 cell lines (GM03399, 85MA, 01HNG, 13HNG, 101CLB, 103CLB) showed significantly higher number of spontaneous  $\gamma$ H2AX foci ( $p < 0.001$ ) than the other cell lines tested, suggesting high genomic instability (Figure 3A).

Ten minutes after a single-helical CT scan exposure, the average number of  $\gamma$ H2AX foci was found to be  $0.93 \pm 0.04$   $\gamma$ H2AX foci per cell in the radioresistant controls, which is slightly higher than the expected value if a  $\gamma$ H2AX foci induction rate of  $37 \pm 4$   $\gamma$ H2AX foci per Gy that would be strictly proportional to the dose was considered ( $0.57$   $\gamma$ H2AX foci per cell was expected at 14.4 mGy) (Figure 3A). This difference with the expected value appeared consistent if spontaneous data were removed ( $0.62 \pm 0.09$   $\gamma$ H2AX foci due to radiation only) (Figure S4A). When  $\gamma$ H2AX foci raw data assessed at 10 min post-irradiation, 5 cell lines (RACKHAM01, RACKHAM12, RACKHAM39, 02HNA, 13HNG) showed a number of  $\gamma$ H2AX foci significantly lower than radioresistant controls ( $p < 0.001$ ) (Figure 3A). When spontaneous background was removed, this difference is highlighted for 02HNA and 13HNG and showed for 85MA, 102CLB and 103CLB, suggesting a lower DSB recognition after irradiation for these cell lines (Figure S4A).

In the radioresistant controls, the number of  $\gamma$ H2AX foci continuously decreased with repair time in the 10 min – 24 h post-irradiation time range up to a  $\gamma$ H2AX foci data value that was not different from zero. By contrast, all the other cell lines tested obeyed different  $\gamma$ H2AX foci kinetics (Figure 3A and S4A). Particularly, the maximal number of  $\gamma$ H2AX foci was reached

at different repair time and at different extent. RACKHAM01, 02HNA and 85MA reach their maximum at 1h, 101CLB at 4h while  $\gamma$ H2AX foci remained nearly constant post-irradiation for 103CLB, 102CLB, 01HNG and 13HNG. All others cell lines reach their maximum at 10min post-irradiation and decreased thereafter. At 24 h post-irradiation, while the number of  $\gamma$ H2AX foci remaining suggested a complete DSB repair, a subset of fibroblasts showed a slow rate of foci disappearance and a number of  $\gamma$ H2AX foci remaining significantly higher than non-irradiated controls. This is the case of 85MA and 01HNG cell lines.

Since significant biological effects are observed in cells showing more than 2  $\gamma$ H2AX foci, the data detailed above were examined with percentage of cells showing more than 2  $\gamma$ H2AX foci as an endpoint (Figure3B). In agreement with the data described above, the cell lines showing more spontaneous  $\gamma$ H2AX foci are the same showing the larger number of cells with more than 2  $\gamma$ H2AX foci. In non-irradiated cells, this endpoint highlighted the genomic instability of GM03399, 85MA, 101CLB, 102CLB and 103CLB. Cells from radiosensitive/radiosusceptible patients elicited larger percentage of cells showing more than 2  $\gamma$ H2AX foci 24h after CT exposure than before the CTscan.

Since ATM activity is required for the formation of  $\gamma$ H2AX foci, we have also investigated the number of nuclear pATM foci assessed in the same experimental conditions than those described above. The pATM data consolidated our conclusions with regard to CT scan conditions (figure 4 et S4).

### ***Radiobiological effects of topogram on human fibroblasts***

In any CT scan examination, a low-dose topogram is done in order to get a “scout view” of the patient. In our conditions, a standard topogram resulted in a 1.1 mGy dose 1 min applied before the chest CT exposure itself. According to the very documented DSB induction rate of  $37 \pm 4$  DSB per Gy, 1 mGy would induce a mean DSB induction rate of 0.04 DSB/cell. While this

pre-irradiation appears to have no significant effect in cells up to 4 h post-irradiation, the number of  $\gamma$ H2AX foci assessed 24 h post-irradiation was found higher in *BRCAl*-mutated cell lines 103CLB and 102CLB (Fig 5A). The excess  $\gamma$ H2AX foci (Fig S6A) and the number of cells with more than 2 foci per cell better illustrated this conclusion (Fig 5B). Since ATM activity is required for the formation of  $\gamma$ H2AX foci, we have also investigated the number of nuclear pATM foci assessed in the same experimental conditions than those described above. The pATM data consolidated our conclusions with regard to CT scan conditions (figure 6 and figure S6B)

### ***Radiobiological effects of chest CT on human mammary epithelial cells***

Breast cells, and notably mammary epithelial cells (MEC), are the most natural cellular models to investigate the risks related to chest CT scan exposure. Here, the same experimental protocol described above was applied to MEC providing from the same 100CLB, 101CLB, 102CLB and 103CLB donors. In order to avoid any confusion, an “F” for fibroblasts and an “epi” label for MEC were added at the end of each cell line name. With regard to spontaneous  $\gamma$ H2AX foci, no difference between fibroblasts and MEC was observed for 100CLB control. By contrast, for 101CLB, 102CLB, and 103CLB, there was a massive difference between the two types of cells (eg : more than 4 times higher for the 101CLB patients : 0.57 +/- 0.13 for fibroblasts vs 4.48 +/- 0.43 101CLB for MEC) (Fig 7).

Ten minutes after a single-helical CT scan exposure, a significant increase of the number of  $\gamma$ H2AX foci, was observed for 100CLBepi, 102CLBepi and 103CLBepi. These values reached at this post-irradiation time represented the maximal  $\gamma$ H2AX data value taken for these cell lines. By contrast, in the 101CLBepi cells, the number of  $\gamma$ H2AX foci decreased continuously with post-irradiation time to reach a lower  $\gamma$ H2AX data value than non-irradiated at 24h post-irradiation ( $p < 0.001$ ) (red stars Fig 7). The 100CLBepi, 102CLBepi and 103CLBepi cell lines also showed significantly more  $\gamma$ H2AX foci at 24h post-irradiation than non-irradiated controls

( $p < 0.001$ ) Fig 7 et fig 3A). With regard to highly damaged cells (HDC), a few number of HDC, if any, were found in 100CLBepi and 101CLBepi cell lines while the percentage of HDC reached 20% in 102CLBepi and 103CLBepi at 10 min post-irradiation (Fig 8). Only hyper-recombination process can be responsible of such massive production of DSB in 10 min only. The kinetics of disappearance of HDC roughly followed the those of  $\gamma$ H2AX foci.

## **Discussion**

Several radiobiological studies have investigated the radio-induced risk of CT scans, especially on lymphocytes (Shi et al 2018). Here, for the first time to our knowledge, we exposed fibroblasts and primary mammary epithelial cells in standard conditions of a chest CT scan by considering the influence of the individual radiosensitivity/susceptibility and the nature of the tissue to be imaged. In parallel, the measurement of the absorbed dose was carried with a new generation optical scintillating fiber dosimeter developed by the Fibermetrix company (Strasbourg, France). This double novel approach contrasts with previous studies since biological dosimetry has been generally performed with calculated dose and/or the CT scan dosimetric indicators, i.e. the CTDI and PDL, which are not necessarily accurate and sensitive for these specific dose values.

### **Delivered Doses**

In this study, we applied standard chest CT scan conditions. According to the report of the French Institute for Radiological Protection[19] about CT scan exposures carried out in France in fifty radiology departments, chest CT scans without injection of contrast agent present an average DLP per acquisition of 402 mGy.cm, an average CTDIvol of 11.5 mGy and an average number of acquisitions of 1.03. Compared to our irradiation conditions (DLP: 136.1, CTDIvol: 8.1 mGy), we are therefore in the lower part of the doses that can be delivered during a standard chest CT scan, which corresponds to the most optimized protocols[20]. Such performance can be explained by the use of a recent CT scan with effective dose reduction technologies for CTDI and that the length to be irradiated was lower on our phantom than in the clinic condition for PDL. Concerning the absorbed dose to the breast, it is estimated between 13 and 20 mGy (Sulieman 2015 + IRSN DRPH/SER N°2010-12), which is in full agreement with our data (average: 14.4 mGy SE: 1.91). With regard to the CTDI of 8.1 mGy, it is noteworthy that this

indicator is not representative of the dose to cells and/or organs. It should also be noted that although chest CT scans are generally carried out in a single acquisition (average: 1.03), this number can reach 8 in some cases (IRSN 2013-12 CT scan dose). In addition, we did not use a contrast agent in this study while iodinated contrast agents are known to result in an increase of the number of acquisitions but also of unrepaired DSB (IRSN 2013-12 scan + shi 2018). Hence, when considering radio-sensitivity/susceptibility, one can keep in mind that we are therefore in “the most favorable and lowest-dose conditions. Nevertheless, a significant amount of IR-induced and non-repaired DSB was observed together with significant inter-individual and inter-tissue differences.

### **Spontaneous DSB :**

The presence of spontaneous  $\gamma$ H2AX foci may reflect spontaneous DSB due to exogenous (environmental stress and/or radiology history) on one side, and on another hand, to impairment in genome maintenance linked to hyper-recombination, a phenomenon generally encountered in individuals suffering from cancer proneness. Firstly, the number of spontaneous  $\gamma$ H2AX foci per cell was found to be significantly higher in seven patients in comparison to the radioresistant control patient 100CLB. This observation, notably for GM03399, 85MA, 101CLB, 102CLB and 103CLB is in agreement with previous observations and with the biological role of ATM, p53, BRCA2 and BRCA1 proteins in genome surveillance. This difference and explanation in spontaneous  $\gamma$ H2AX foci is particularly true for mammary epithelial cells, in which the cell cycle control must be even more efficient because of the general tendency of epithelial cells to proliferate.

### **Radiation-induced DSB**

Our findings suggest that individual factor in skin fibroblasts and mammary epithelial cells may elicit different clinical responses when  $\gamma$ H2AX and pATM foci are taken as endpoints. Since these biomarkers reflect the functionality of DSB recognition and repair, our data provide clues that, even for one-helical CT scan exposures (corresponding here to 14.4 mGy), the biological dose can be different from the physical one (Fig 3). The number of  $\gamma$ H2AX foci assessed in 01HNG and 85MA cell lines were found to be significantly different after chest CT scan than in unirradiated conditions (p value <0.05). Let us remind that the 01HNG cell line is known to be hypersensitive to low doses[21] and the 85MA patient suffered from Li-Fraumeni syndrome (p53 heterozygous mutations). All these data are consistent with a significant impact of individual factor on the final response to IR, even in CT scan conditions. With regard to mammary epithelial cells, a significant difference was found between the epithelial cell lines tested here and their fibroblast counterparts, supporting again the strong influence of cell type on the response to IR. (Fig 7).

### **Topogram effect**

The effect of the topogram which corresponds to a dose pattern of 1.1 mGy + 1 min + 14.4 mGy compared to 14.4mGy alone suggested dose repetition effect in *BRCAl*-mutated 102CLB and 103CLB cell lines (Fig 5). Indeed, while the difference in the number of  $\gamma$ H2AX foci per cell was low with a single helical exposure, it becomes significant after the use of the topogram (p<0.05). A similar phenomenon has been observed with mammography screening conditions in which a succession of two low doses exists (2 mGy + 3 min + 2mGy)[7]. In fact, the findings have been interpreted by considering that several minutes between two doses are not sufficient to permit a full DNA breaks recognition and repair. As a consequence, at the beginning of the second dose, chromatin is more decondensed which favors the induction of additional DSB (LORD effect)[7]. However, in the case of radiosensitive/susceptible cells, this condition



enhances the hyper-recombination process which is responsible for additional endogenous DNA breaks (the LADI effect)[7]. Interestingly, the LADI effect was observed in mammary epithelial cells providing from patients at high cancer risk, including BRCA1-mutated women. Obviously, further investigations are needed to better understand the consequences of such dose repetition effects.

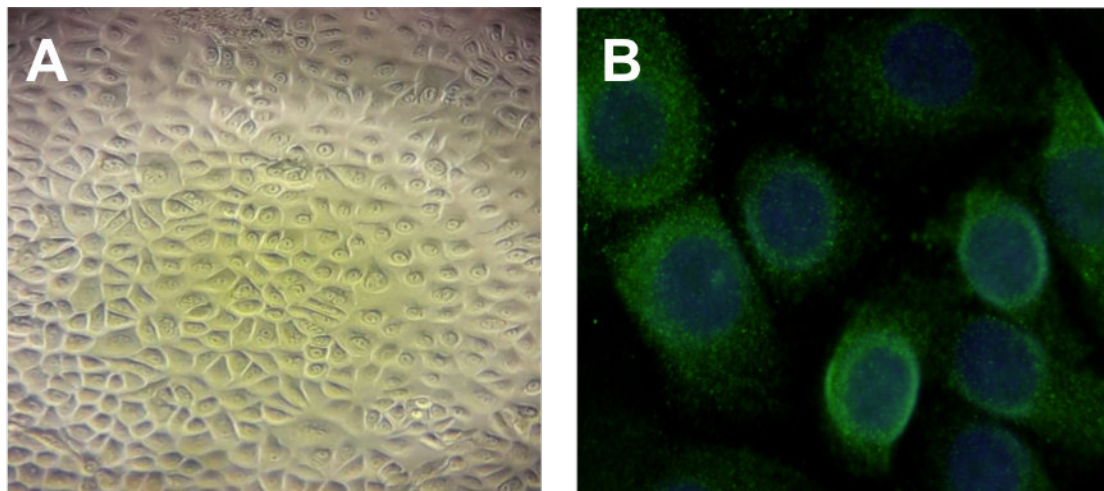
### **HDC cells**

Cells with more than 15  $\gamma$ H2AX foci were observed and considered as HDC (highly damaged cells) (Figure 8). DAPI-staining indicated that the morphological shape of HDC was clearly different from that of apoptotic cells. Furthermore, the increase of the HDC yields reported here cannot correspond to the proportion of cells that would be in S phase, and while, at the opposite of a replication-dependent effect, the HDC yields increased with dose. A more plausible interpretation would be that HDC contain a number of misrepaired DSB that, despite their number, allow cells to survive. Again, such interpretation would be consistent with the observation that HDC are much more numerous in *BRCA1*-mutated 102CLB and 103CLB cells that are supposed to be more instable in comparison to the radioresistant control 100CLB cells. Further molecular and cellular investigations are needed to better understand the potential link between HDC, cellular lethality and carcinogenesis, notably in patients whose cells undergo hyper-recombination.

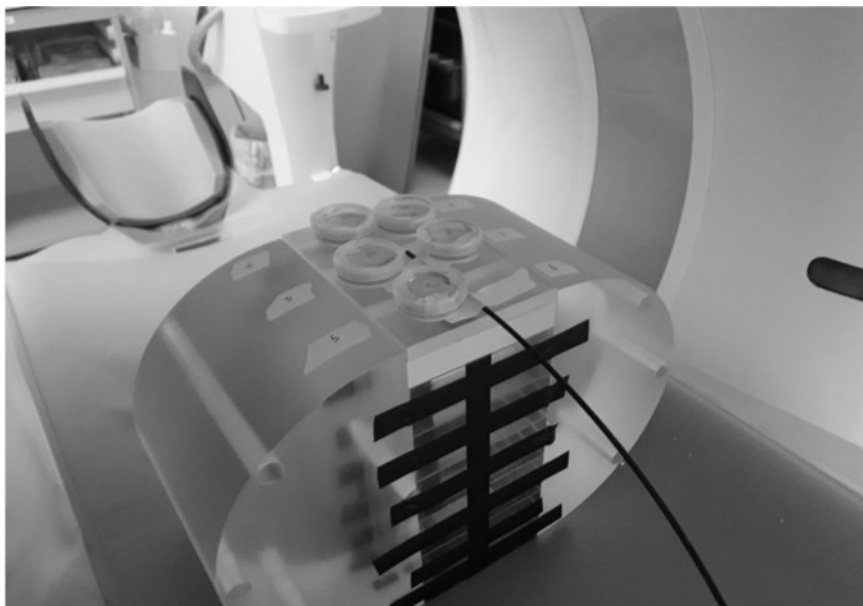
## Conclusion

This work was done in exact Chest CT scan conditions and with relevant cellular models. It highlights the existence of DNA damage induced by chest CT scan and quantifiable by the well-documented  $\gamma$ H2AX and pATM data. By considering  $\gamma$ H2AX data, the radiation response is exacerbated by the presence of some gene mutations responsible for radiosensitivity and/or radiosusceptibility. However, a larger cohort is needed to consolidate these conclusions. It must be stressed here that the absence of biomarker specific to radiosusceptibility is one of the major limitations of the studies aiming to evaluate the potential risk of CT scan exposure. Even if DSB misrepair, hyperrecombination and genomic instability are systematically associated with cancer proneness, a reliable biomarker that would be applicable in CT scan conditions is required. Nevertheless, it is noteworthy that if, for a given physical dose, the number of recognized and/or residual DSB significantly differ from the controls, it should be sufficient to integrate these findings in the discussion about the justification of the CT scan exam since some asymptomatic patients at high genetic risk can be exposed with a chest CT scan. Obviously, again, a number of additional studies are needed to quantify the risk for a given genetic status. However, our data presented here provides new clues that, even for low-dose exposure applied in CT scan exams, biological response to ionizing radiation may be different from one patient to another and from one tissue to another and should be taken into account.

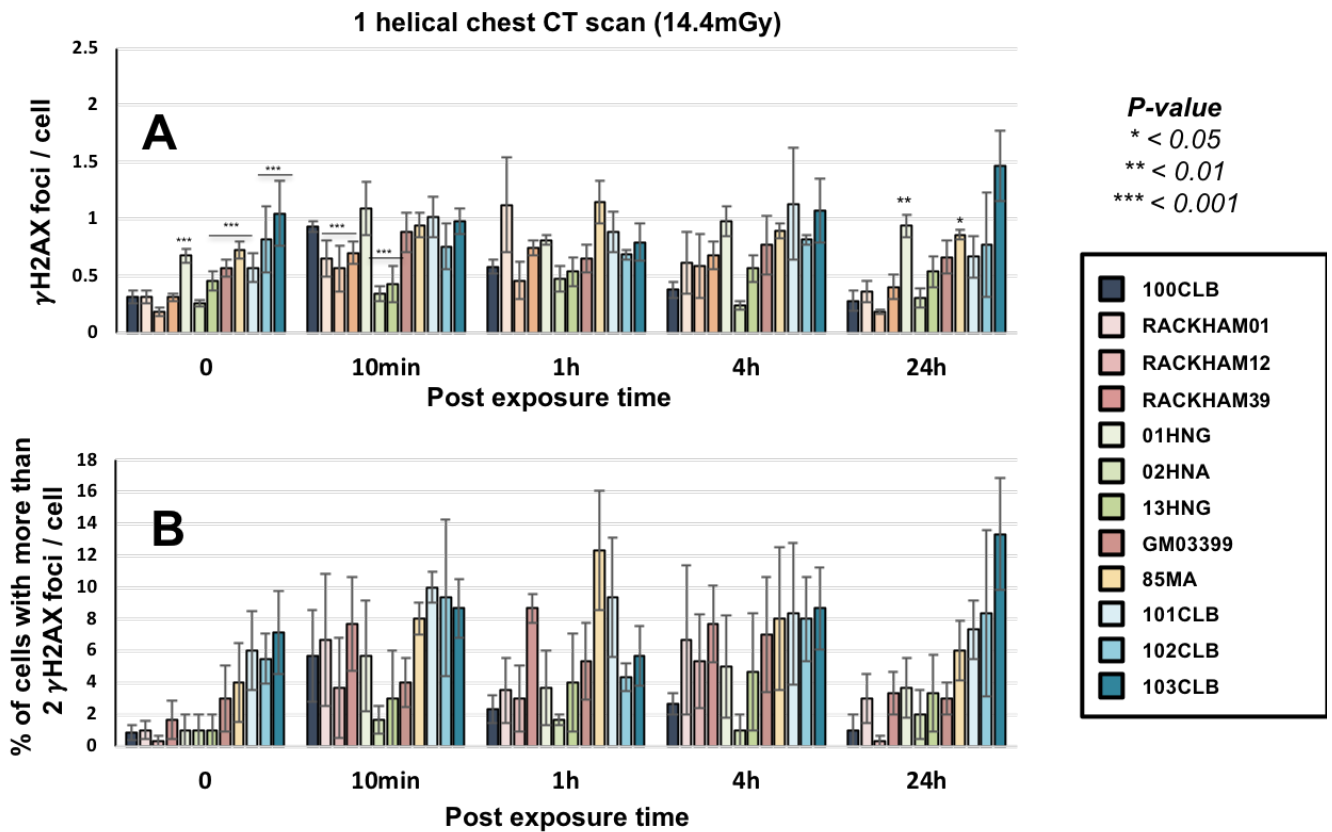
## Figures



**Figure 1 :** Mammary Epithelial cells culture (A) and associated CK18 immunofluorescence staining (B)

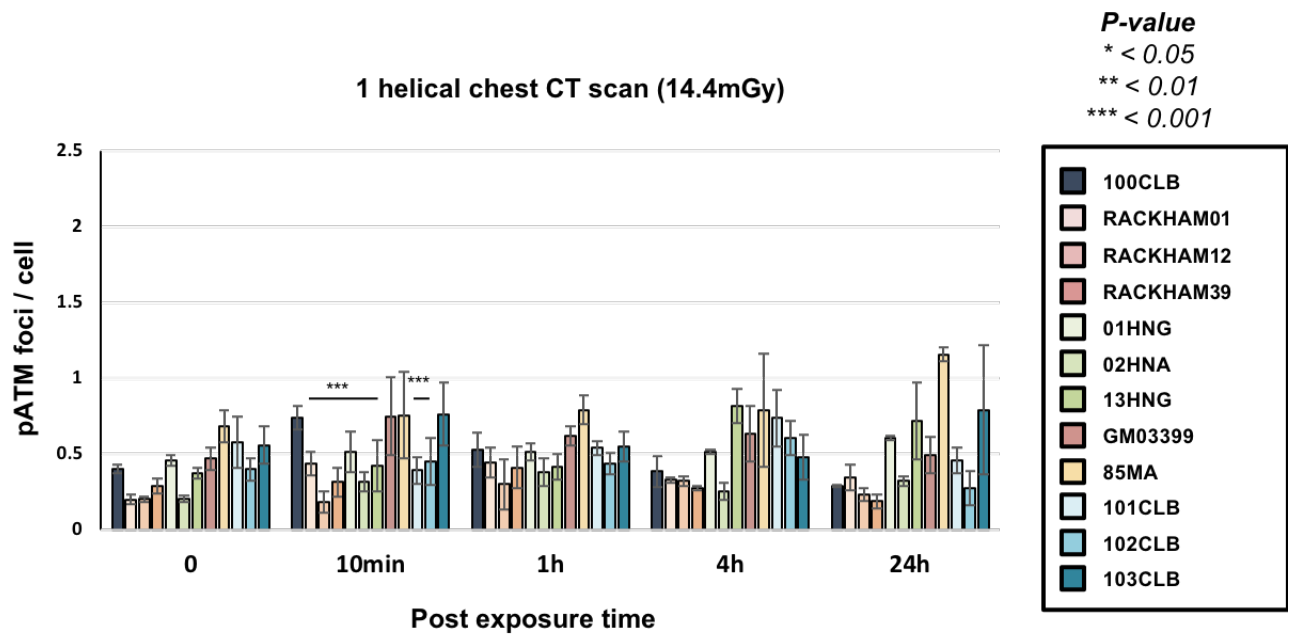


**Figure 2 :** Chest CT scan cells exposures set-up with dosimetric fiber. PMMA fibroblasts and mammary epithelial cells 32cm diameter phantom This phantom was made in an oval shape to better feet to a real human body



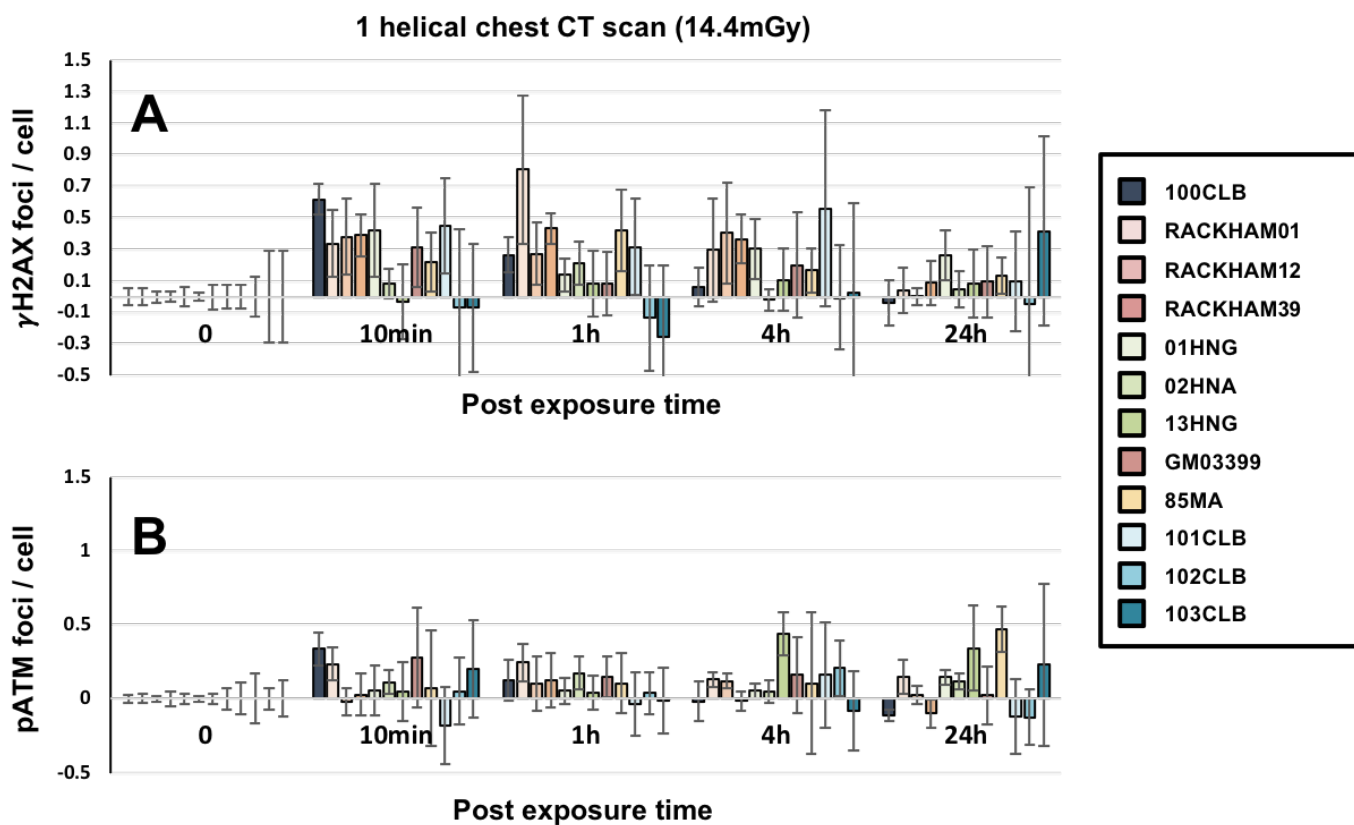
**Figure 3.** Kinetics for  $\gamma$ H2AX foci loss in fibroblasts after a chest CT scan (**A**) at the indicated times after CT ( $t_0$  = non irradiated). (*Lower*) Data shows the mean number of cells with more than 2 foci after a chest CT scan (**B**) Error bars indicate SEM of the 3 experiments.

\* stars for non-irradiated conditions and at 10min post-irradiation correspond to a statistically significant difference from the radioresistant control. The stars at 24h post irradiation correspond to a statistically significant difference from the non-irradiated conditions.



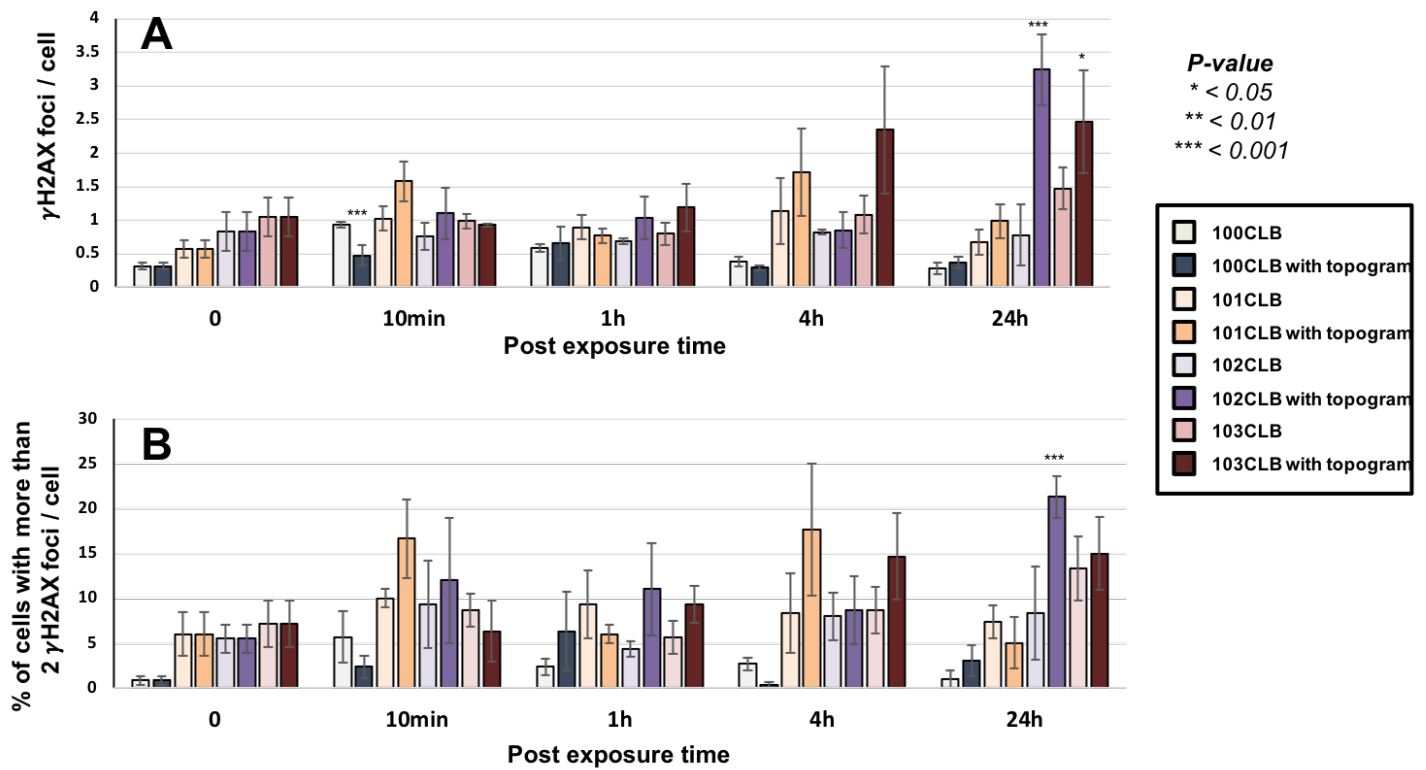
**Figure 4.** Kinetics for pATM foci loss in fibroblasts after a chest CT scan at the indicated times after CT (t0 = non irradiated). Error bars indicate SEM of the 3 experiments.

\*stars at 10min post-irradiation times correspond to a statistically significant difference from the radioresistant control.

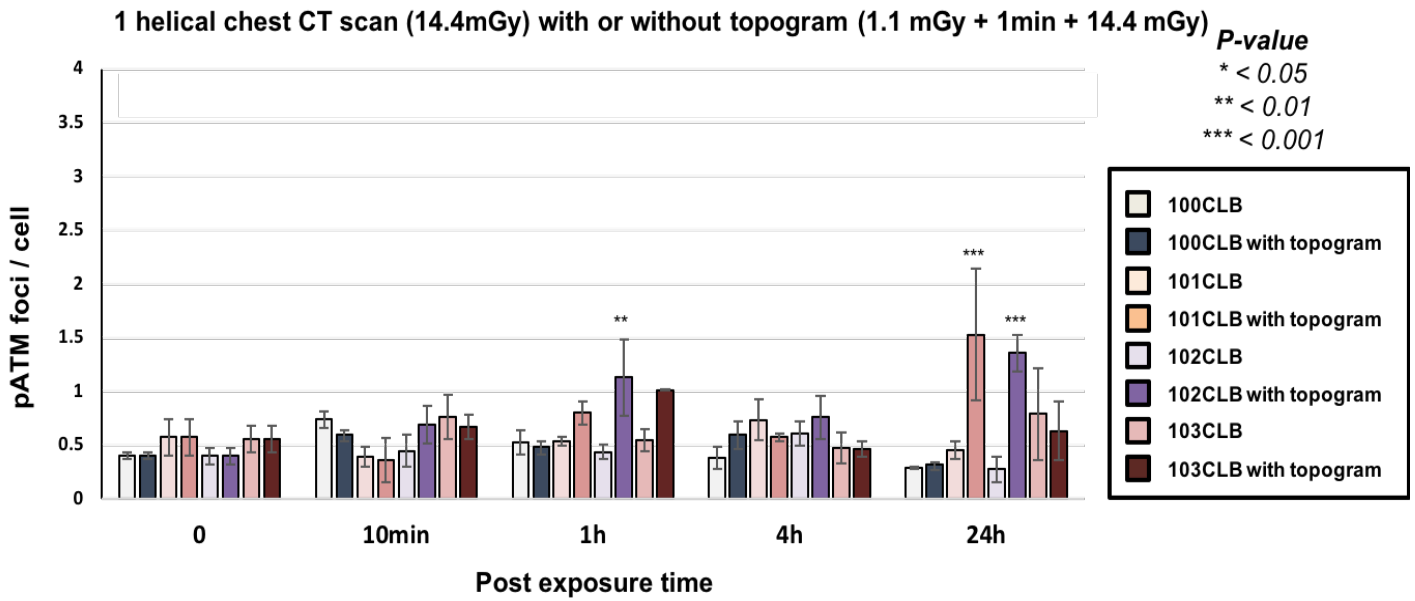


**Figure S4 :** Kinetics for excess  $\gamma$ H2AX (**A**) and pATM (**B**) foci loss in fibroblasts after a chest CT scan at the indicated times after CT ( $t_0$  = non irradiated). Data were derived by background subtraction for each individual. Error bars indicate SEM of the 3 experiments.

1 helical chest CT scan (14.4mGy) with or without topogram (1.1 mGy + 1min + 14.4 mGy)

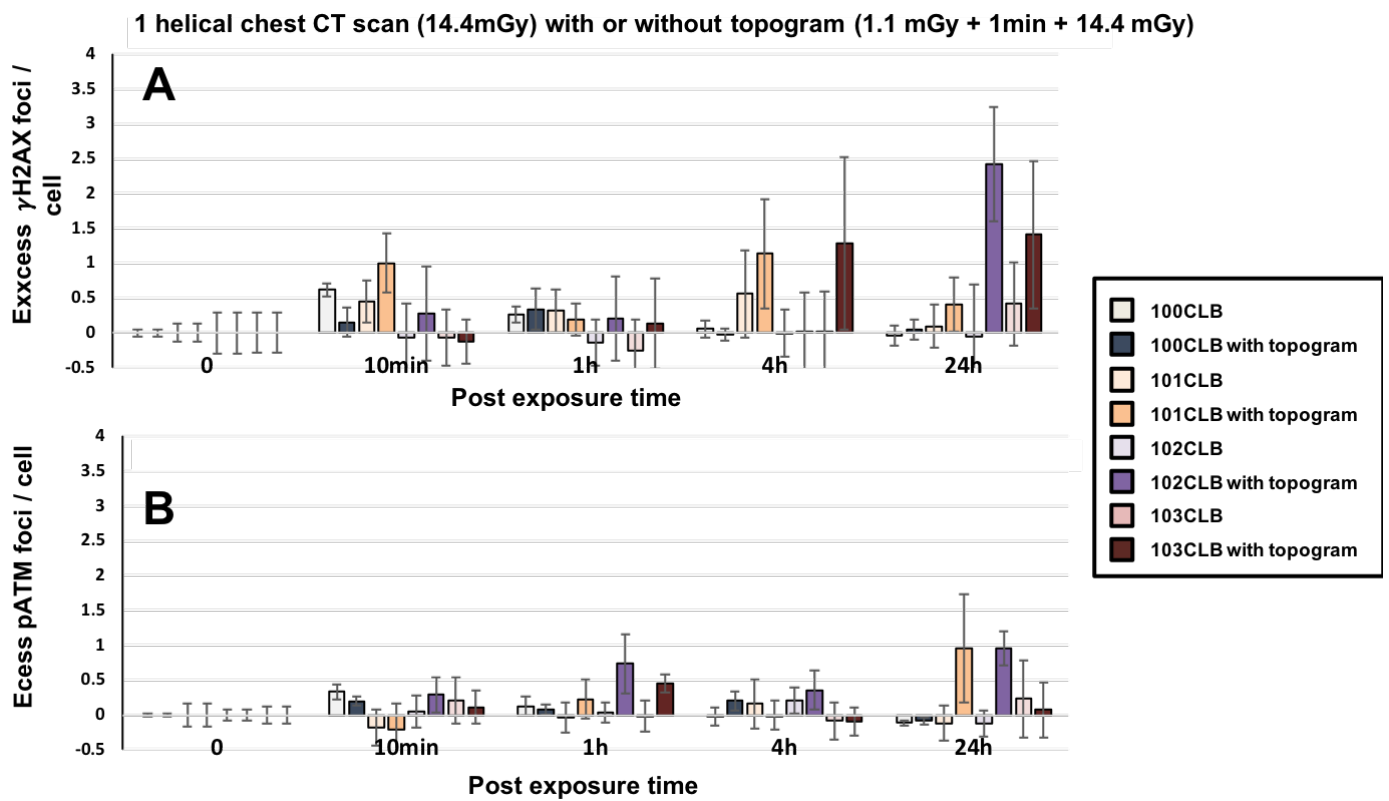


**Figure 5 :** Kinetics for  $\gamma$ H2AX foci loss in fibroblasts after a chest CT scan with or without topogram (**A**) at the indicated times after CT ( $t_0$  = non irradiated). (*Lower*) Data shows the mean number of cells with more than 2 foci after a chest CT scan with or without topogram (**B**) Error bars indicate SEM of the 3 experiments. \*stars correspond to a statistically significant difference between conditions with or without topogram for the same cell lines.

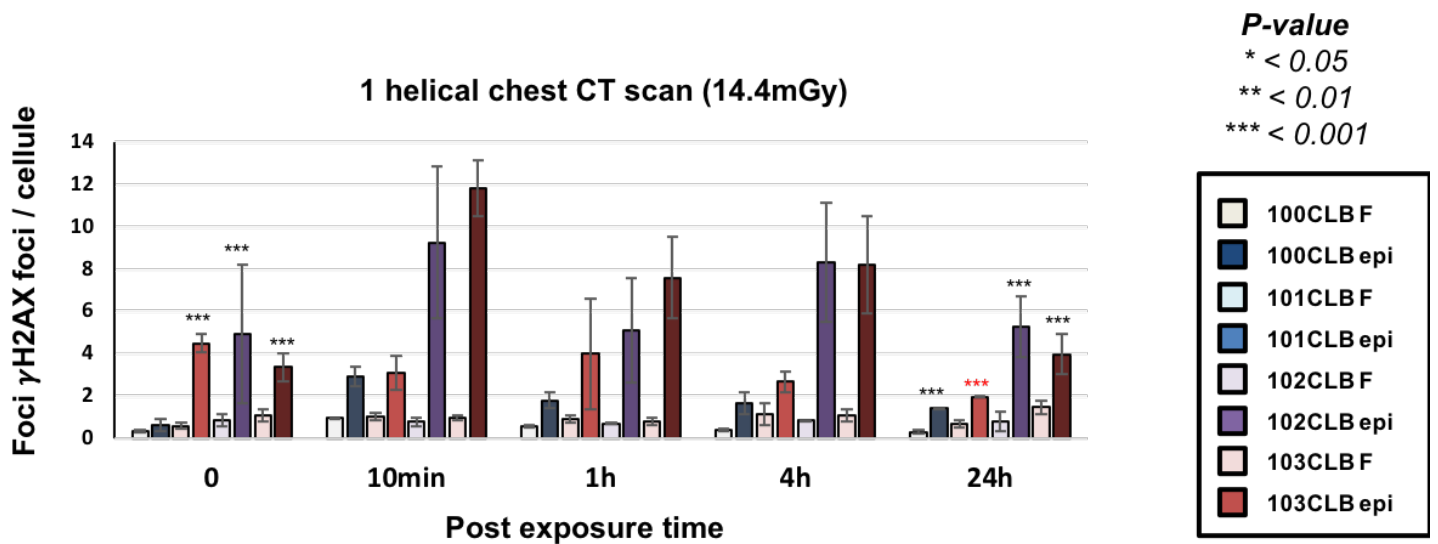


**Figure. 6.** Kinetics for pATM foci loss in fibroblasts after a chest CT scan with or without topogram at the indicated times after CT (t0 = non irradiated). Error bars indicate SEM of the 3 experiments. \*stars correspond to a statistically significant difference between conditions with or without topogram for the same cell lines.

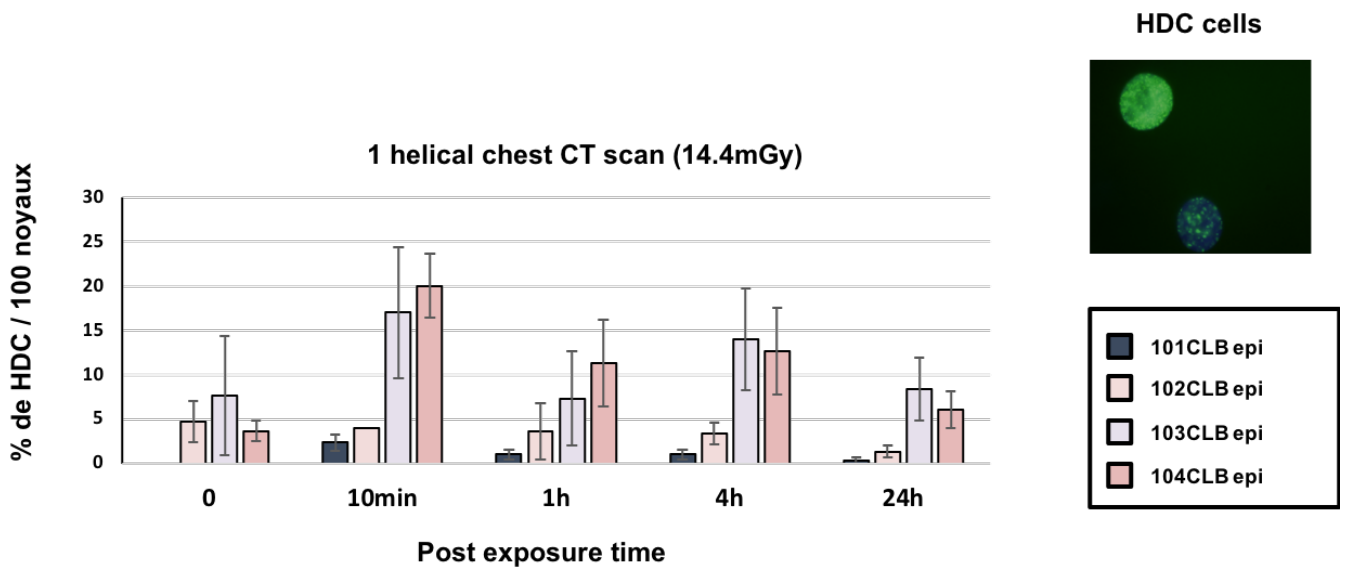




**Figure. S6.** Kinetics for excess  $\gamma$ H2AX (A) or pATM (B) foci loss in fibroblasts after a chest CT scan at the indicated times after CT ( $t_0$  = non irradiated). Data were derived by background subtraction for each individual. Error bars indicate SEM of the 3 experiments.



**Figure. 7.** Kinetics for  $\gamma$ H2AX foci loss in fibroblasts (F) (light colors) and in mammary epithelial cells (epi) (dark colors) after a chest CT scan at the indicated times after CT (t0 = non-irradiated). Error bars indicate SEM of the 3 experiments. \*stars for non-irradiated conditions correspond to a statistically significant difference between fibroblasts and MEC for the same cell lines. \*stars at 24h post-irradiation corresponds to a statistically significant difference with non-irradiated conditions for the same tissues and cell lines. Red stars corresponds to a statistically significant difference lower than non-irradiated condition.



**Figure. 8.** Kinetics of Highly damaged cells (HDC) (>15 foci) in mammary epithelial cells after a chest CT scan at the indicated times after CT (t0 = non irradiated). Error bars indicate SEM of the 3 experiments.

1. Granzotto A, Benadjaoud MA, Vogin G *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**:450–60.
2. National Council on Radiation Protection and Measurements. Ionizing Radiation Exposure of the Population of the United States. *NCRP Rep 160* 2009.
3. Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire. Exposition de la population française aux rayonnements ionisants liée aux actes de diagnostic médical en 2012. 2012;**PRP-HOM**.
4. Shi L, Tashiro S. Estimation of the effects of medical diagnostic radiation exposure based on DNA damage. *J Radiat Res* 2018;**59**:ii121–9.
5. Foray N, Randrianarison V, Marot D *et al.* Gamma-rays-induced death of human cells carrying mutations of *brca1* or *brca2*. *Oncogene* 1999;18:7334-7342.
6. Pijpe A, Andrieu N, Easton DF *et al.* Exposure to diagnostic radiation and risk of breast cancer among carriers of BRCA1/2 mutations: retrospective cohort study (GENE-RAD-RISK). *Bmj* 2012;**345**:e5660–e5660.
7. Colin C, Devic C, Nol A *et al.* DNA double-strand breaks induced by mammographic screening procedures in human mammary epithelial cells. *Int J Radiat Biol* 2011;**87**, DOI: 10.3109/09553002.2011.608410.
8. Lobrich M, Rief N, Kuhne M *et al.* In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations. *Proc Natl Acad Sci* 2005;**102**:8984–9.
9. Jin L, Qu Y, Gomez LJ *et al.* Characterization of primary human mammary epithelial cells isolated and propagated by conditional reprogrammed cell culture. *Oncotarget* 2018;**9**:11503–14.
10. Munier M, Sohier T, Jung J *et al.* Procédé de détermination de la dose d'irradiation déposée dans un scintillateur par un rayonnement ionisant et dispositif associé. *FR2981757(B1)* ; date priorité 24/10/2011; délivrance 04042014 Bull 14/14.
11. Munier M, Sohier T, Jung J *et al.* Method for determining the irradiation dose deposited in a scintillator by ionising radiation and associated device. *WO2013060745(A1)*, date priorité 24/10/2011, *Publ Int 02052013* ; *US9244178(B2)*, délivrance 26012016.
12. 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**:2860–71.
13. Joubert A, Zimmerman 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.

14. Thomas C, Charrier J, Massart C *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;84:533-548.
15. Massey F. The Kolmogorov-Smirnov Test for Goodness of Fit. *J Am Stat Assoc* 1951;**46(253)**:68–78.
16. Mann H, Whitney D. On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *Ann Math Stat* 1947;**18(1)**:50–60.
17. Wilcoxon F. Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biometrics Bull* 1945;**1(6)**:80–3.
18. Kruskal W, Wallis W. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *J Am Stat Assoc* 1952;**47(260)**:583–621.
19. IRSN. *Doses Délivrées Aux Patients En Scanographie. Analyse Des Recueils de Doses de 9 Services de Radiologie En France 2012.*, 2013.
20. Sulieman A, Tammam N, Alzimami K *et al.* Dose reduction in chest CT examination. *Radiat Prot Dosimetry* 2015;**165**:185–9.
21. Colin C, Granzotto A, Devic C *et al.* MRE11 and H2AX biomarkers in the response to low-dose exposure: Balance between individual susceptibility to radiosensitivity and to genomic instability. *Int J Low Radiat* 2011;**8**, DOI: 10.1504/IJLR.2011.044191.

## **9.6 Pourquoi la dose biologique est-elle si différente de la dose physique?**

### **Petits rappels de radiobiologie pour tous.**

Clément Devic<sup>1</sup>, Michel Bourguignon et Nicolas Foray<sup>1,#</sup>

*<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR1052, Radiobiology Group, Cancer Research Centre of Lyon, 69008, Lyon, France;*

*<sup>1</sup>Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire, (IRSN), 92260 Fontenay aux Roses, France*

#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

## Introduction

Dans le monde du radiodiagnostic, l'une des plus importantes notions est la dose physique, autrement dit l'énergie absorbée par la matière irradiée. Rappelons que le contraste et la qualité de l'image dépendent directement de cette absorption. La dose physique est également cruciale pour l'évaluation du risque lié aux radiations ionisantes. En effet, un des apports majeurs de l'épidémiologie des radiations, resté consensuel jusqu'à aujourd'hui est la valeur des doses-seuils au-dessus desquelles le risque de cancer devient significatif : 100 mSv pour les leucémies et 200 mSv pour les cancers solides. C'est notamment de ces valeurs, issues des survivants d'Hiroshima que les principales recommandations de la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) ont été proposées.

Pourtant, avec le temps, nous avons oublié dans quel contexte la cohorte des survivants d'Hiroshima avait été analysée et que signifiaient vraiment ces doses-seuils de 100 et 200 mSv. Quatre remarques s'imposent :

- Ces doses-seuils ont été calculées à partir de l'hypothèse que tous les survivants avaient le même risque initial de cancer, en d'autres termes, que tous étaient égaux face aux radiations. Ce point pose la question de la radiosensibilité individuelle : sommes-nous vraiment tous égaux face aux radiations ?
- Ces doses-seuils ont été calculées à partir d'un modèle mathématique qui considère que les effets radioinduits sont proportionnels à la dose. Les effets biologiques sont-ils toujours proportionnels à la dose ?
- Ces doses-seuils ne sont valables que pour une exposition « flash », c'est-à-dire « en une seule fois » et non étalée dans le temps. L'effet de doses successives est-il toujours équivalent à l'effet de la somme des doses ?
- Ces doses-seuils sont issues de la cohorte des survivants d'Hiroshima mais non de Nagasaki car les caractéristiques physiques de la bombe et les cancers observés n'étaient pas les mêmes. Afin de calculer la dose équivalente et la dose efficace, le facteur de pondération  $W_R$  liés aux rayons X, gamma et électrons est fixé à 1, quelle que soient les énergies. Cette hypothèse est-elle toujours vérifiée ? De façon plus spécifique, 1 mSv de rayons X issus d'un mammographe produit-il toujours le même effet qu'1 mSv de rayons X issus d'un scanner ou d'un appareil de radiothérapie ?

Nous nous proposons de revenir brièvement sur ces 4 remarques afin de faire l'état de la littérature pour mieux estimer le risque radioinduit.

**La radiosensibilité individuelle : une notion centenaire mais un terme souvent galvaudé**

Le fait que certains individus soient plus sensibles aux radiations que d'autres a été évoqué par les pionniers des radiations dès 1906 et une première publication sur le sujet date de 1911. Toutefois, le terme « radiosensibilité » a d'abord été utilisé par les scientifiques français ou allemands pour désigner les premières brûlures radiques. Ce n'est qu'à partir des premiers congrès internationaux de radiologie où l'anglais devint la langue unique des sciences et l'accumulation des données sur les cancers radioinduits (notamment avec l'épisode des « Radium Girls »), que le terme « radiosensitivity » fut utilisé à la fois pour désigner les brûlures radiques et les cancers radioinduits. A travers le même terme, ces deux notions vont alors se confondre alors que les mécanismes moléculaires qui sont à leur origine sont clairement différents : les brûlures radiques sont associées à la *mort* cellulaire alors que les cancers radioinduits sont associés à une *transformation* cellulaire. D'ailleurs, cette dualité clinique a une réalité moléculaire puisque ces deux notions correspondent également aux deux modes de réparation des cassures de l'ADN des cellules de mammifères :

- la réparation par suture consiste à liguer les deux brins coupés. C'est le mode de réparation majoritaire chez les mammifères et notamment pour les cellules en quiescence. Un défaut de suture conduit systématiquement à une radiosensibilité tissulaire significative.
- la réparation par recombinaison consiste à couper une séquence d'ADN au hasard et à l'insérer dans le trou formé par la première cassure. Ce mode de réparation des cassures produit donc...des cassures. Alors que ce mode est essentiel pour les premières divisions cellulaires (son absence conduit à la non-viabilité des cellules), son manque de contrôle (hyper-recombinaison) conduit à la production en chaîne de nombreuses cassures de l'ADN qui seront mal réparées et entraîneront à leur tour la formation d'autres cassure. L'hyper-recombinaison est clairement associée à une forte prédisposition au cancer.

Dans chaque cellule, ces 2 modes rentrent en compétition et leur différente contribution fait que nous sommes différemment radio-sensibles (risque de réactions tissulaires radioinduites) et radio-susceptibles (risque de cancers radioinduits). Ces deux notions peuvent être liées dans certaines conditions : par exemple, plus l'individu est radiosensible, plus il a un risque élevé de cancer. L'inverse n'est pas vrai. Par exemple, les mutations homozygotes du gène ATM (ataxie telangiectasie) conduisent à la plus forte radiosensibilité connue chez l'homme et les patients atteints sont très prédisposés aux lymphomes. A l'inverse les mutations hétérozygotes de p53 (syndrome de Li-Fraumeni) ne sont pas très radiosensibles (pas ou peu de réactions secondaires en radiothérapie) mais restent très fortement prédisposés au cancer.



Pour finir, l'âge a souvent été considéré comme un facteur de risque, notamment dans la phrase souvent reprise par la CIPR : « *les enfants sont plus radiosensibles que les adultes* ». Tout d'abord, « radiosensibles » signifie ici « *plus à risque de cancers* », ce qui est représentatif de la confusion évoquée plus haut. D'autre part, cette phrase qu'en devenant adulte, on devient radiorésistant, ce qui est un non-sens scientifique. Enfin, si l'on considère un enfant et un centenaire de même statut génétique à risque, on observera toujours plus de cancers chez l'enfant exposé que chez le centenaire exposé car on aura plus de recul sur l'observation. Ainsi, l'âge n'est pas un facteur de risque, il favorise une observation. Par contre, à moins d'une exposition aux radiations non antérieure, le fait qu'un enfant ait un cancer très tôt dans sa vie, suggère une forte prédisposition génétique au cancer et donc à tous les cancérogènes, y compris les radiations : il devient alors fortement prédisposé au cancer radioinduit.

Aujourd'hui, les travaux de notre laboratoire permettent de proposer une classification de la radiosensibilité humaine en 3 groupes. On estime que 75-85% d'individus de la population sont radiorésistants et à risque de cancer faible (groupe I). On considère que 5-20 % des individus sont radiosensibles et/ou radio-susceptibles (groupe II). Moins de 1% sont hyper-radiosensibles (risquant leur vie après une session de radiothérapie) et hyper-radiosusceptibles (avec un risque de 100% d'avoir un cancer radioinduit après 100 mSv (groupe III). Dans les services de radiologie, rencontrer des patients du groupe II devrait donc être fréquent pour les adultes notamment pour les mammographies mais également pour les enfants en pédiatrie (scanner). Même si les cas restent exceptionnels, il est possible de rencontrer également des cas de groupe III en pédiatrie. Dans ce cas, tout radiodiagnostic devra être justifié.

### **Le phénomène d'hypersensibilité aux faibles doses : un exemple représentatif d'un effet non proportionnel à la dose**

Historiquement, le phénomène d'hyper-radiosensibilité aux faibles doses (HFD) a été observé *in vitro* à travers des tests de survie cellulaire, Il conduit à un excès d'environ 25% de létalité cellulaire entre 2 mGy et 0.8 Gy sur tout type cellulaire, plutôt modérément radiosensible (groupe II). En d'autres termes, toute irradiation dans cette gamme de dose (qui concerne le radiodiagnostic) peut produire un effet équivalent à une dose 5 à 10 fois plus forte. Ce phénomène n'est pas limité à la létalité cellulaire mais concerne également les cassures de l'ADN, des chromosomes et surtout la transformation cellulaire et les cassures mal réparées. Notre groupe a fourni une explication à ce phénomène et nous invitons le lecteur plus curieux à lire les références suivantes. Typiquement représentatif d'un effet biologique non-

proportionnel à la dose, ce phénomène n'a pas encore été pris en compte dans l'évaluation du risque radioinduit.

### **Les effets de répétitions de dose : quand 2+2 n'est pas toujours égal à 4**

Lorsque les cellules reçoivent une dose de radiation, de nombreux dommages de l'ADN sont produits immédiatement (quelques microsecondes) après l'irradiation et la reconnaissance puis la réparation de ces dommages s'effectuent et peut se prolonger jusqu'à 24 h après irradiation : à ce stade, tout ce qui n'est pas réparé ne le sera plus. Ainsi, une 2<sup>ème</sup> dose infligée au moins 24 h après la 1<sup>ère</sup> dose (comme souvent en radiothérapie) produira un effet qui s'ajoutera à celui de la 1<sup>ère</sup> dose. Par contre, si la 2<sup>ème</sup> dose suit la 1<sup>ère</sup> dose de moins de 24 h, des effets supra-additifs sont à prévoir. Par exemple, si les cassures de l'ADN ne sont pas encore complètement réparées, la 2<sup>ème</sup> dose irradiera un ADN débobiné, moins compacté et donc plus accessible : les dommages induits par la 2<sup>ème</sup> dose seront plus délétères que ceux induits par la 1<sup>ère</sup> dose. Un exemple typique de l'impact de ces effets de répétition de dose a été observé en mammographie. Généralement, une double-incidence mammographique face-profil correspond à une dose de 2 mGy suivie de 3 min en moyenne suivies à nouveau de 2 mGy. Lors d'une étude publiée en 2011, nous avons montré qu'un tel protocole d'irradiation aboutit systématiquement à un effet équivalent à plus de 4 m Gy. C'est ce que nous avons appelé l'effet LORD<sup>1</sup>, valable quel que soit le groupe de radiosensibilité, c'est-à-dire même pour les radiorésistants. L'ampleur de l'effet LORD dépend surtout de l'intervalle de temps entre les doses. Un autre effet de répétition de dose peut s'ajouter à l'effet LADI<sup>2</sup>. En effet, l'hyper-recombinaison des cellules des patients prédisposés au cancer est stimulée par l'irradiation par un phénomène d'auto-entretien: plus les doses s'accumulent, plus les cassures sont produites par recombinaison. L'accumulation d'un grand nombre de cassures mal réparées peu aboutir à un effet équivalent à une dose 10 fois plus faible ( $2+2 > 10$ ). Contrairement à l'effet LORD, l'effet LADI dépend de la dose et du statut génétique.

En conclusion, des doses répétées à des intervalles de l'heure, ou de la minute pourraient conduire à des effets équivalents à des doses bien supérieures à la somme des doses.

### **Des rayons X de différentes énergies et nocivité**

L'énergie des rayons utilisés dans le radiodiagnostic est généralement comprise entre 29 kV (mammographie) et 100 kV (scanner). Les recommandations de la CIPR indiquent que

---

<sup>1</sup> LOw and Repeated Dose effect

<sup>2</sup> Low dose-induced and AdDItional breaks effect

l'efficacité biologique relative (c'est-à-dire la nocivité) des rayons X ne dépend pas de l'énergie ( $W_R=1$ ) Intuitivement, on peut penser que plus l'énergie est faible, moins les effets seront nocifs. Il est vrai que le nombre de dommages de l'ADN est plus faible quand l'énergie est plus faible car les microdépôts d'énergie qui créent les ionisations sont moins nombreux et moins denses en moyenne. Ainsi, les rayons X de faible énergie induisent moins de cassures double-brin de l'ADN qui sont formées par les microdépôts d'énergie les plus denses. Par contre, ils induisent plus de cassures simple-brin que les rayons de plus haute énergie. La conséquence est un nombre réduit de « trous » dans l'ADN mais dans un environnement où l'ADN est débobiné. Les cassures double-brin formées par les rayons X de faible énergie sont donc plus rares mais plus difficilement réparables. Les rayons X de faibles énergies produiront donc des effets d'autant plus délétères que l'individu exposé appartient au groupe II.

### **Conclusions**

Les recommandations de la CIPR ont sauvé des vies et ont contribué à faire diminuer les doses de radiation tant pour les patients que pour le personnel de santé. Toutefois, certains principes ne résistent plus aux dernières avancées scientifiques. En effet, la dose physique ne suffit plus à évaluer le risque lié aux faibles doses de radiation. La radio-sensibilité et la radio-susceptibilité individuelles peuvent contribuer à augmenter significativement l'effet physique des radiations : dans les cas à risque, la biologie peut créer plus de dommages de l'ADN qui, s'ajoutant à ceux induits par la physique, produit des effets équivalents à de plus fortes doses. Une meilleure connaissance des effets évoqués plus haut permettrait ainsi d'affiner les règles de radioprotection en vigueur.

## 9.7 Qu'est ce que la réponse adaptative ? Entre vrais effets et fausses interprétations

Clément Devic<sup>1,2</sup> et Nicolas Foray<sup>1,#</sup>

<sup>1</sup>*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR1052, Groupe de Radiobiologie, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, 69008, Lyon, France;*

<sup>2</sup>*Société Fibermetrix, (partenaire CIFRE), 4 Rue la Fayette, 67100 Strasbourg*

### Résumé

Au cours de nos lectures sur les effets des faibles doses de radiations, certains termes spécifiques comme « réponse adaptative » ou « *hormesis* » reviennent souvent mais sans jamais convaincre par leur définition et leur portée. Cet article fait le point sur le premier phénomène. Nous reviendrons sur le deuxième ultérieurement.

### Introduction

Une dose de radiations ionisantes déclenche une cascade d'événements physiques, chimiques, biologiques et cliniques dont le déroulement va du nanomètre au mètre et de la femtoseconde à l'année. Probablement parce que les principes de la vaccination sont contemporains des premières descriptions des réponses radio-induites (Louis Pasteur est mort 3 mois seulement avant la découverte des rayons X), l'interprétation des phénomènes radio-induits a été souvent influencée par les lois de l'immunologie.

### L'influence de l'immunologie

C'est le cas de l'hypothèse selon laquelle les effets délétères des radiations pourraient être réduits par un premier « stimulus », comme l'exposition à une faible dose de radiations. D'ailleurs, l'une des plus remarquables illustrations de cette influence de l'immunologie en radiobiologie est la notion de « radiovaccination » que Claudius Regaud a proposée avant 1914. Ce pionnier avait en effet observé que le fractionnement de la dose pendant plus de dix jours de radiothérapie pouvait conduire à une augmentation de la radiorésistance de la tumeur. Regaud nomma cette radiorésistance induite « radiovaccination » mais sans jamais

préjuger des mécanismes sous-jacents. Plus tard, en pleine campagne de vaccination contre la tuberculose et la diphtérie, ce terme fut pris au pied de la lettre [1].

### Réponse adaptative et *hormesis*

L'hypothèse « immunologique » dans les phénomènes radio-induits fut à l'origine d'un grand nombre d'études dans lesquelles deux termes se retrouvent fréquemment : « réponse adaptative » et « *hormesis* » [2] [3]. Une analyse sémantique révèle que le terme « réponse adaptative » date du XIX<sup>e</sup> siècle et est largement utilisé en biologie évolutive, physiologie et zoologie, alors que le terme « *hormesis* » est moins fréquent et a été introduit en 1943 (Devic et al., publication soumise). En effet, quand Southam et Ehrlich découvrirent que des extraits d'écorce de cèdre rouge stimulaient la croissance de champignons à faibles concentrations mais étaient fongicides à fortes concentrations, ils proposèrent le terme « *hormesis* » (stimuli en grec) pour définir une telle particularité [4]. Il fut logiquement utilisé pour décrire des phénomènes dose dépendants dont la courbe effet - dose est en forme de « J » ou de « U », c'est-à-dire avec des seuils spécifiques définissant les gammes de concentrations « stimulantes » ou « toxiques » (Figure 1). Curieusement, la notion d'effet stimulant laissa progressivement la place dans les textes à la notion d'effet « bénéfique » par opposition à l'effet « toxique » observé à plus fortes doses. Pourtant, la stimulation de la croissance de micro-organismes (comme dans le cas de Southam et Ehrlich) ou de cellules (comme dans le cas d'une perte de contrôle du cycle ou d'une transformation) n'est pas forcément bénéfique pour l'homme. L'*hormesis* fera l'objet d'un article spécifique.

### La RA survient après deux doses successives

Contrairement à l'*hormesis*, qui décrit un phénomène à dose unique mais observable sur une gamme spécifique de faibles doses, le terme « réponse adaptative » (RA) est utilisé pour décrire un phénomène survenant après deux doses successives : une première dose  $d_{RA}$  (*priming dose*, ou dose d'amorçage), suivie d'une certaine période de temps,  $\Delta t_{RA}$ , elle-même suivie d'une seconde dose,  $D_{RA}$ , généralement plus forte que la première, appelée *challenging dose* en anglais, que l'on pourra traduire librement dans ce contexte par « dose inductrice de l'effet » (Figure 1). On parle alors d'une « réponse adaptative » si l'effet biologique produit par  $d_{RA} + \Delta t_{RA} + D_{RA}$  est plus faible que l'effet produit par  $D_{RA}$  seule. Dans ce cas, la dose d'amorçage  $d_{RA}$  est généralement interprétée comme le stimulus des « défenses cellulaires »

contre les effets biologiques de la dose inductrice  $D_{RA}$  [3]. Notons cependant que la nature de telles défenses n'a jamais été identifiée formellement.

### **La réponse adaptative : un très grand nombre de protocoles expérimentaux**

Afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de la RA et la portée de ce phénomène, nous avons passé en revue tous les articles publiés sur le sujet à partir des années quatre-vingt. Nous nous sommes focalisés sur les études impliquant les cellules humaines car les données sur les plantes, les micro-organismes voire les mammifères non-humains sont difficilement extrapolables à l'homme (Devic et al., publication soumise).

### **L'étude d'Olivieri et coll. : un taux d'aberrations chromosomiques plus bas après prétraitement**

La première étude du phénomène dans les cellules humaines a été publiée en 1984 par Olivieri et coll. [5]. Les auteurs ont d'abord incubé des lymphocytes avec de la thymidine tritiée ( $0,1$  to  $0,01 \mu\text{Ci.ml}^{-1}$ ) pendant 2 ou 3 jours puis les ont soumis à une dose de  $1,5 \text{ Gy}$ . Dans ces conditions, le taux d'aberrations chromosomiques avec le prétraitement est apparu plus bas que celui obtenu sans prétraitement [5]. Notons que dans ce cas historique, la dose d'amorçage était délivrée de façon continue et non pas en une seule fois. Ce phénomène a été observé sur un grand nombre de types cellulaires différents, qu'ils soient normaux ou tumoraux et avec un grand nombre de paramètres biologiques comme la survie cellulaire, la cytogénétique (cassures ou aberrations chromosomiques) ou le taux de dommages de l'ADN. En revanche, ce qui frappe surtout, c'est que, en 40 ans d'études sur la RA, quels que soient la technique ou le type cellulaire, le phénomène n'est mesurable que si  $d_{RA}$  est comprise entre  $0,001$  et  $0,5 \text{ Gy}$ ,  $\Delta t_{RA}$  entre 2 heures et 24 heures et  $D_{RA}$  entre  $0,1$  et  $5 \text{ Gy}$  [2] [3].

### **La période $\Delta t_{RA}$ permet une réparation complète des cellules radiorésistantes**

Que nous apprennent de telles contraintes expérimentales ? Une dose  $d_{RA}$  comprise entre  $0,001$  et  $0,5 \text{ Gy}$  produit un stress oxydatif suffisant pour créer simultanément 10 à 5 000 dommages de bases, 1 à 500 cassures simple brin de l'ADN et 0,04 à 20 cassures double brin de l'ADN par cellule. Toutefois, la période  $\Delta t_{RA}$  de 2 heures à 24 heures qui suit  $d_{RA}$  permet une réparation complète de tous ces dommages et une disparition totale du stress oxydatif

pour les cellules radiorésistantes. Ainsi, si le prétraitement  $d_{RA} + \Delta t_{RA}$  n'a aucun effet significatif avant l'exposition à  $D_{AR}$ , on comprend pourquoi la RA n'est pas observée pour les cellules radiorésistantes (Devic et al., publication soumise). D'ailleurs, comme la notion de radiorésistance est une notion « bornée » (si la cellule a réparé tous ses dommages de l'ADN, elle ne peut réparer plus), une diminution de la radiosensibilité ou de la transformation cellulaire ne peut être observée sur des cellules radiorésistantes. Ainsi, pour observer une diminution de la radiosensibilité, il faut que les cellules soient déjà radiosensibles. Curieusement, cette conclusion importante n'a pas été mise en exergue dans la littérature alors qu'elle donne une information précieuse sur le statut nécessaire pour observer la RA (Devic et al., publication soumise).

### **La réponse adaptative : un phénomène réservé aux cellules radiosensibles**

#### **Des conditions d'observation peu courantes**

Le fait que la RA ne soit observée que sur des cellules radiosensibles limite donc la portée du phénomène. Tout d'abord, notons que le scénario  $d_{RA} + \Delta t_{RA} + D_{RA}$  ne correspond pas à des expositions courantes dans le domaine médical, professionnel ou environnemental : on peut éventuellement évoquer le scénario d'un scanner de positionnement de la tumeur ( $d_{RA}$  de l'ordre du cGy) qui serait suivi après quelques heures ( $\Delta t_{RA}$ ) d'une dose de radiothérapie ( $D_{RA} = 2$  Gy). Dans ce cas précis, la RA pourrait effectivement aboutir à une radioprotection (augmentation de la radiorésistance) des tissus sains. Mais elle pourrait aussi aboutir à la radioprotection des tumeurs radiosensibles, ce qui ne saurait être considéré comme un bénéfice pour le patient. Les conditions  $d_{RA} + \Delta t_{RA} + D_{RA}$  sont tellement peu courantes en pratique qu'un groupe japonais, pour étudier la RA, n'a pas hésité à exposer des cellules aux radiations cosmiques lors d'une mission sur la station spatiale internationale (équivalent de  $d_{RA}$ ) puis, de retour sur terre, à les soumettre à une forte dose de radiation (2 Gy). Un tel scénario ne correspond évidemment à aucune situation plausible [6]. Les conditions d'observation de la réponse adaptative restent donc du domaine de la science fondamentale.

#### **Un lien avec l'hypersensibilité aux faibles doses ?**

Dans un article traitant du phénomène d'hypersensibilité aux faibles doses (HFD), nous avons montré qu'une faible dose comprise justement entre 0,001 et 0,5 Gy (comme  $d_{RA}$ )

pouvait produire des effets comparables à 2 à 10 fois la dose initiale : excès de mort cellulaire ou excès de mutations [7]. De façon intéressante, le phénomène d'HFD ne s'observe que sur des cellules modérément radiosensibles. Il n'existe pas pour les cellules radiorésistantes et hyperradiosensibles, comme pour la RA. À ce stade, trois questions se posent :

1. La réponse adaptative a-t-elle un rapport avec les réactions immunologiques ?
2. Quel mécanisme général peut expliquer la réponse adaptative ?
3. Quel est le lien entre les phénomènes RA et HFD ?

### **La réponse adaptative en radiobiologie n'est pas expliquée par l'immunologie**

Dans le cas d'une exposition aux radiations ionisantes, l'application d'une ou de plusieurs séquences de  $d_{RA} + \Delta t_{RA}$  ne change pas la radiosensibilité intrinsèque de la cellule de façon durable. La RA est observée dans un grand nombre de types cellulaires, sans dépendre du taux d'immunoglobulines ni de la présence dans les cellules d'un système de défense immunologique fonctionnel (lymphocytaires ou non). Enfin, la RA n'est observée ni dans les cellules radiorésistantes ni dans les cellules hyperradiosensibles alors que celles-ci sont respectivement issues de patients immunonormaux et immunodéficients. Ainsi, l'hypothèse « immunologique » historique concernant la RA s'avère aujourd'hui infondée. Il faut donc trouver une autre explication.

### **La théorie du transit d'ATM : un mécanisme expliquant la réponse adaptative ?**

La protéine ATM, dont les mutations sont responsables de l'ataxie télangiectasie, le syndrome associé à la plus forte radiosensibilité connue chez l'homme, est un acteur majeur de la réponse aux radiations [8]. Jusqu'à présent, elle avait toujours été localisée dans le noyau des cellules. Pourtant, à partir de l'une des plus grandes collections de cellules humaines radiosensibles (collection appelée COPERNIC), notre groupe a montré qu'elle vient surtout du cytoplasme des cellules et que la vitesse du transit d'ATM du cytoplasme au noyau après irradiation conditionne la radiosensibilité [9] [10].

### **La protéine d'ATM stimule la réparation de l'ADN par suture**

Les protéines ATM sont présentes sous formes dimériques dans le cytoplasme. L'irradiation crée un stress oxydant qui les monomérisent d'une façon dépendante de la dose. Les



monomères d'ATM, moins lourds que les dimères, peuvent alors se diffuser dans le noyau [9] [10]. Une fois dans le noyau, ces monomères d'ATM, actifs, stimulent la réparation des cassures de l'ADN par suture (mode de réparation fidèle et majoritaire) et inhibent la réparation fautive par recombinaison (mode de réparation infidèle et minoritaire). Ainsi, la cellule répare vite et mieux (Figure 2). Dans le cas de cellules modérément radiosensibles, les monomères d'ATM restent piégés par un excès de protéines mutées surexprimées, qui sont généralement responsables de syndromes génétiques associés à une forte prédisposition au cancer et une réaction tissulaire anormale aux radiations (Figure 2).

### **$d_{RA} + \Delta t_{RA}$ produisent un apport supplémentaire de monomères d'ATM dans les cellules radiosensibles**

Dans le cas de cellules radiorésistantes, comme on l'a dit plus haut, le flux d'ATM est amplement suffisant pour que l'effet de  $d_{RA} + \Delta t_{RA}$  soit nul, rendant donc la RA non mesurable. Pour les cellules hyperradiosensibles (pas de transit d'ATM ou ATM non fonctionnel), l'effet de  $d_{RA} + \Delta t_{RA}$  est déjà délétère et donc s'ajoute à celui de  $D_{RA}$  : la RA n'est pas mesurable non plus. Dans le cas de cellules modérément radiosensibles soumises à une  $d_{RA}$  comprise entre 0,001 et 0,5 Gy, la diffusion des monomères d'ATM est environ 2 fois moins importante que dans les cellules radiorésistantes. Par exemple, environ 40 000 et 20 000 monomères d'ATM passent respectivement la membrane nucléaire après 0,2 Gy suivi de 6 heures ( $d_{RA} + \Delta t_{RA}$ ) pour les cellules radiorésistantes et modérément radiosensibles. Toutefois, une dose de 2 Gy ( $D_{RA}$ ) produit en 10 min pour le même type de cellules respectivement environ 30 000 et 16 000 monomères d'ATM (Devic et al., publication soumise). Pendant  $\Delta t_{RA}$  les monomères d'ATM produits par  $d_{RA}$  peuvent perdre leur activité en se « redimérisant ». Pourtant, même si environ 20 % de monomères d'ATM apportés par  $d_{RA}$  restent actifs pendant  $\Delta t_{RA}$  (soit environ 4 000 monomères dans notre cas), cet apport représente environ 25 % (4 000 sur 16 000) des monomères d'ATM actifs supplémentaires pour répondre à  $D_{RA}$ . Dans ce cas précis, un  $\Delta t_{AR}$  trop court ne permettrait pas un flux suffisant ; un  $\Delta t_{AR}$  trop long aboutirait à des monomères inactifs. Ainsi, dans les cellules radiosensibles,  $d_{AR} + \Delta t_{AR}$  produirait donc bien une stimulation de la réparation des dommages de l'ADN par un apport supplémentaire de monomères d'ATM. L'intensité de la réponse adaptative dépendrait donc fortement de la radiosensibilité des cellules irradiées.

## Conclusions

La réponse adaptative (c'est-à-dire la réduction de l'effet biologique d'une forte dose de radiation par une dose plus faible) est donc bien un phénomène observé de façon expérimentale. Ce n'est pas un artefact ! Il survient cependant dans des conditions spécifiques :

6. Un scénario d'exposition de type  $d_{RA} + \Delta t_{RA} + D_{RA}$  doit être appliqué, avec  $d_{RA}$  comprise entre 0,001 et 0,5 Gy,  $\Delta t_{RA}$  entre 2 heures et 24 heures et  $D_{RA}$  entre 0,1 et 5 Gy.
7. Ce phénomène peut être observé sur de nombreux types cellulaires mais les cellules doivent être caractérisées par une certaine radiosensibilité ou une certaine radiosusceptibilité : la RA n'est pas mesurable sur les cellules radiorésistantes ni sur les cellules hyperradiosensibles. Elle dépend donc fortement du statut génétique.
8. Le bénéfice de ce phénomène pour l'homme reste très limité, voire inexistant, d'autant plus que la première condition rend ce scénario d'exposition réalisable quasi exclusivement en laboratoire. Toutefois, en clinique, il faudrait vérifier si un scanner de positionnement suivi d'une dose de radiothérapie peut conduire à la radioprotection de la tumeur.
9. Tout comme pour l'hypersensibilité aux faibles dose (HFD), la théorie du transit d'ATM apporte aujourd'hui une explication moléculaire à ce phénomène. Contrairement aux hypothèses historiques et bien que la dose d'amorçage fasse penser à une vaccination, ce phénomène n'a rien à voir avec les lois de l'immunologie.
10. Après bien des dérives sémantiques et des interprétations erronées, l'existence de la RA, basée sur la succession d'une dose faible et d'une dose forte (qui est souvent elle-même toxique ou mutagène) et qui n'est observée que sur des cellules radiosensibles ou transformées, ne constitue pas une preuve que les faibles doses soient bénéfiques.

Auteur pour correspondance : 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

## **Bibliographie**

1. Nogier T., Regaud C., « Décroissance de la radiosensibilité des tumeurs malignes traitées par des doses successives et convenablement espacées des rayons X : auto-immunisation contre les rayons », *Comptes-Rendus de l'académie des sciences*, 1914, vol. 58, p. 1711-1714.
2. Calabrese E. J., « *Hormesis: a fundamental concept in biology* », *Microbial Cell*, 2014, vol. 1 , n° 5, p. 145-149. DOI : [10.15698/mic2014.05.145](https://doi.org/10.15698/mic2014.05.145).
3. Calabrese E.J., Bachmann K.A., Bailer A.J. et al., « *Biological stress response terminology : Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework* », *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2007, vol. 222, n° 1, p. 122-128. DOI : [10.1016/j.taap.2007.02.015](https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.02.015).
4. Southam C. M., Ehrlich J. « *Effects of Extract of western red-cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture* », *Phytopathology*, 1943, vol. 33 p. 517-524.
5. Olivieri G., Bodycote J., Wolff S., « *Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine* », *Science*, 1984, vol. 223, n° 4636, p. 594-597. DOI : [10.1126/science.6695170](https://doi.org/10.1126/science.6695170).
6. Takahashi A., Su X., Suzuki H. et al., « *P53-dependent adaptive responses in human cells exposed to space radiation* », *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2010, vol. 78, n°4, p. 1171-1176. DOI : [10.1016/j.ijrobp.2010.04.062](https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.04.062).
7. Devic C., Foray N., Bourguignon M., « Pourquoi la dose biologique est-elle si différente de la dose physique ? », *Docteur Imago*, 2017, n° 3. <https://docteurimago.fr/formation/dose-biologique-differente-de-dose-physique/>.
8. Foray N., Bourguignon M., Hamada N. « *Individual response to ionizing radiation* », *Mutation Research / Reviews in Mutation Research*, décembre 2016, vol. 770, partie B, p. 369-386. DOI: [10.1016/j.mrrev.2016.09.001](https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.09.001).
9. Granzotto A., Benadjaoud M. A., Vogin G., 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, vol. 94, n° 3, p. 450-460. DOI : [10.1016/j.ijrobp.2015.11.013](https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2015.11.013)

10. 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, vol. 92, n° 3, p. 117-131. DOI : [10.3109/09553002.2016.1135260](https://doi.org/10.3109/09553002.2016.1135260)

## Légendes

**Figure 1. Représentation schématique des principaux effets radiobiologiques.** Il est à noter que l'*hormesis* est un effet de dose (ou débit de dose) unique alors que la réponse adaptative est un effet dû à une succession de doses.

**Figure 2. Théorie du transit d'ATM et réponse adaptative :** À la suite d'une exposition à une dose  $d_{RA}$ , des monomères d'ATM se diffusent dans le noyau. Après une période de temps  $\Delta t_{RA}$ , un excès de monomères d'ATM subsiste dans le noyau. Si les cellules sont exposées à une forte dose  $D_{RA}$ , de nombreux monomères d'ATM sont produits auxquels s'ajoute l'excès de monomères (bleus) produits par  $d_{RA} + \Delta t_{RA}$  qui contribuent à réduire l'effet de  $D_{RA}$ . L'effet  $d_{RA} + \Delta t_{RA} + D_{RA}$  est donc dans ce cas inférieur à l'effet produit par la dose  $D_{RA}$  seule.

## **9.8 Hormesis : les faibles doses de radiation sont-elles vraiment bonnes pour notre santé ? Entre mythes et réalité biologique**

Clément Devic<sup>1,2</sup> et Nicolas Foray<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité UA8 « Radiations : Défense, Santé et Environnement », Centre Léon-Bérard, 69008, Lyon, France;*

<sup>2</sup>*Société Fibermetrix, (partenaire CIFRE), 4 Rue la Fayette, 67100 Strasbourg*

Au cours de nos lectures sur les effets des faibles doses de radiations, certains termes spécifiques comme « réponse adaptative » ou « hormesis » reviennent souvent mais sans jamais convaincre par leur définition ni leur portée. Dans un précédent numéro, nous avons fait le point sur la réponse adaptative, résultat de la succession d'une faible puis d'une plus forte dose. Faisons ici le point sur l'hormesis que certains chercheurs décrivent comme la preuve de l'existence d'un effet bénéfique des faibles doses de radiations.

#Auteur pour correspondance: Dr. Nicolas Foray

INSERM UA8 - Bât Cheney A - Centre Léon-Bérard - 28 Rue Laennec 69008 LYON  
FRANCE

## Introduction

Dès la découverte de la radioactivité naturelle et des rayons X, de nombreux chercheurs, médecins ou amateurs de science ont défendu l'hypothèse que des faibles doses de radiation pouvaient être bénéfiques pour notre santé. Certains exemples, souvent documentés de façon inégale, sont restés célèbres : la crème de beauté Tho-Radia, préparation à base de thorium et de radium, qu'un certain Docteur Alfred Curie (qui n'a jamais existé) avait mise au point et qui fut commercialisée jusqu'en 1968 <sup>(1)</sup>; les radio-vaporariums des établissements thermaux où les vapeurs radioactives sont réputées avoir une action thérapeutique sur certaines maladies chroniques et qui sont toujours en activité commerciale <sup>(2)</sup> ; certains survivants d'Hiroshima qui auraient une survie prolongée et dont le risque de cancer radioinduit serait négatif, les radiations les protégeant du cancer <sup>(3)</sup> ; des cas isolés d'individus souffrant de maladies chroniques ou de cancers dont le tableau clinique s'améliore après des exposition répétées aux faibles doses<sup>(4)</sup>. Quelle est la validité scientifique de ces exemples ? Comment se retrouver aujourd'hui dans le flot d'informations concernant les faibles doses de radiations, mélange de *fake news*, de débats animés entre différentes communautés de chercheurs et de données scientifiques obtenues avec des protocoles ou des modèles cellulaires d'étude très différentes et souvent peu comparables ? Derrière tous ces effets, il y a un terme peu courant qui les résume : l'hormésis. Depuis ces 30 dernières années, l'hormésis a fait l'objet de très nombreuses publications aux conclusions souvent polémiques. L'hormésis est d'autant plus d'actualité qu'en octobre 2018, le Pr. E.J. Calabrese, grand spécialiste de l'hormésis, fut auditionné devant la Commission de l'Environnement du Sénat des Etats-Unis pour soutenir le projet de l'Agence de Protection de l'Environnement (EPA) d'adopter comme référence le modèle de risque radioinduit non linéaire avec seuil et d'abandonner le modèle linéaire sans seuil basé sur l'hypothèse qu'un risque radioinduit nul ne peut être observé qu'à une dose nulle de rayonnement <sup>(5)</sup>. Nous nous devons donc de faire le point sur ce phénomène.

Comme nous l'avons montré dans un numéro précédent de ce journal <sup>(6)</sup>, l'hormésis, est un terme issu du grec qui veut dire stimuli. Il a été introduit pour la première fois en 1943 par Southam et Ehrlich qui découvrirent que des extraits d'écorce de cèdre rouge stimulent la croissance de champignons à faibles concentrations mais sont fongicides à fortes concentrations <sup>(7)</sup>. Ce terme fut logiquement utilisé pour décrire des phénomènes dose-dépendants dont la courbe dose-effet est en forme de « J » ou de « U » c'est-à-dire avec des seuils spécifiques définissant les gammes de concentrations « stimulantes » ou « toxiques ». L'usage du terme « hormesis » en radiobiologie changea progressivement de sens pour désigner, non plus un effet *stimulant* mais un effet *bénéfique*, ce qui rajouta un peu de subjectivité au phénomène : qu'est-

ce qui est bénéfique pour des micro-organismes ? Pour des cellules de mammifères ? Pour des cellules saines ? Pour des cellules tumorales ? C'est le radiobiologiste américain Thomas D. Luckey qui popularisa l'hormésis dans les années 80 avec un livre qui eut un grand succès aux Etats-Unis et qui fut à l'origine de la création d'une petite communauté de scientifiques et de médecins défendant l'hormésis et le modèle non-linéaire avec seuil <sup>(8)</sup>. Que nous apprennent les publications traitant de l'hormésis depuis le livre de Luckey ?

### **Un grand nombre de protocoles expérimentaux mais très peu de données sur l'homme**

La lecture de l'ouvrage de Luckey déroute par la diversité des protocoles et des modèles cellulaires utilisés : on passe des bactéries aux levures, des champignons aux plantes, des rongeurs aux cellules humaines, tous irradiés de façon différente tant en dose qu'en débit de dose. Les doses bénéfiques considérées comme faibles varient du nGy au Gy. Pourtant, sur les centaines de publications traitant de l'hormésis, il y a finalement peu de données expérimentales originales sur l'homme ou les cellules humaines (moins de 7% des études) et une très grande majorité de revues (plus de 60%) qui reprennent, à l'image de l'ouvrage de Luckey, les différents acquis en n'hésitant pas à mélanger les données issues d'espèces différentes <sup>(4)</sup>. De plus, les protocoles expérimentaux apparaissent très liés aux groupes de recherche et, comme souvent en biologie, le choix des modèles cellulaires d'étude ne semble être justifié que par leur pouvoir de prolifération en culture *in vitro* ou par leur disponibilité dans le laboratoire.

A ce stade, rappelons pourquoi une extrapolation de données issues de micro-organismes ou d'animaux à l'homme n'est pas pertinente en radiobiologie. Citons au moins 3 raisons majeures :

- **la taille des cellules** : Du fait de leur taille, les micro-organismes sont beaucoup plus radiorésistants que les cellules humaines car la chromatine y est plus condensée et moins d'interaction rayonnement-matière y est attendu. Ainsi, pour tuer des levures ou des bactéries il faut des milliers de Gy. A moindre échelle, les cellules de mammifères sont également plus petites que les cellules humaines. D'ailleurs, la dose létale moyenne des rongeurs est de l'ordre de 15 Gy. Celle de l'homme est de 4,5 Gy. Ainsi, les phénomènes radiobiologiques ne sont pas observés tous à la même échelle de doses suivant le modèle cellulaire et une simple règle de trois ne suffit pas à extrapoler les données d'une espèce à une autre.
- **les modes de réparation de l'ADN** : En plus de ces différences *quantitatives* fondamentales, il existe des différences *qualitatives*. Les modes de réparation des

dommages de l'ADN peuvent différer d'une espèce à une autre. On sait par exemple qu'il existe deux grands modes de réparation des cassures double-brin de l'ADN (CDB) chez les mammifères: la suture et la recombinaison. La suture consiste simplement à « resouder » les brins d'ADN cassés : c'est un mode très actif dans les cellules quiescentes et notamment chez l'homme, qu'il soit adulte ou non <sup>(9)</sup>. A l'inverse, la recombinaison qui consiste à insérer une séquence d'ADN dans le trou formé par la cassure est le mode dominant pour les cellules en prolifération et donc chez les micro-organismes où la réparation par suture est minoritaire. Les modes de réparation par suture et par recombinaison qui sont en compétition dans chaque cellule n'ont pas le même poids suivant l'espèce considérée. De plus, si la réparation par recombinaison perd son contrôle, le processus de réparation devient lui-même producteur de cassures et des erreurs de séquences peuvent se propager très vite : c'est le phénomène d'*hyper-recombinaison*. Les syndromes génétiques humains liés à une forte prédisposition au cancer sont généralement associés à l'*hyper-recombinaison*. Ainsi des différences *qualitatives* fondamentales peuvent apparaître entre espèces : après une irradiation de quelques Gy, une cellule humaine meurt (mort cellulaire radioinduite, radiosensibilité), une cellule de rongeur peut survivre et se transformer (cancers radioinduits, radiosusceptibilité) alors qu'une bactérie ne sera pas affectée significativement. Par ces exemples, on comprend toute la difficulté à extrapoler à l'homme des données expérimentales issus de modèles de laboratoire <sup>(9)</sup>.

- **La notion de bénéfice dépend de l'espèce :** Quand Southam et Erlich parlent d'hormésis en observant la stimulation de la croissance des champignons, ils considèrent l'accélération de croissance comme une « bonne chose » <sup>(7)</sup>. Pourtant, dans le cas d'un fibroblaste humain non-transformé, une prolifération exacerbée est synonyme de perte de contrôle du cycle, de transformation cellulaire voire de cancérisation : il n'y a pas de bénéfice. Pour l'homme, au contraire, l'effet est délétère. Ainsi, sans tenir compte de cette distinction importante, beaucoup d'auteurs ont interprété la stimulation de croissance ou de survie cellulaire pour des modèles tumoraux comme un bénéfice pour la cellule. Cet exemple est représentatif de la difficulté d'interprétation des données pour aborder l'hormésis sur des critères objectifs <sup>(4)</sup>.



## **L'hormésis est observé seulement sur les cellules normales et radiorésistantes**

Quand on se focalise sur les quelques dizaines de publications originales disponibles concernant le phénomène d'hormésis sur l'homme, on peut définir 4 grandes catégories <sup>(4)</sup>:

- **Les données expérimentales *in vitro*** : elles sont issues de cellules humaines soumises à une irradiation unique. Elles concernent des études d'une ou deux lignées cellulaires, souvent immortalisées ou tumorales, soumises à une gamme de doses variées. Les paramètres utilisés sont également très variés : dommages de l'ADN, micronoyaux, pouvoir de prolifération cellulaire ou survie clonogénique
- **Les données expérimentales *ex vivo*** : elles sont toutes issues de lymphocytes circulants prélevés sur des personnes soumises à une seule dose ou à un seul débit de dose. C'est généralement le cas des études de personnes ayant été soumises à une forte radioactivité naturelle, à des taux variables de radon ou à une exposition professionnelle (ex : travailleurs du nucléaire). Les paramètres utilisés sont également très variés. Ils peuvent être moléculaires (taux d'oxydation), cellulaires (survie cellulaire, dommage de l'ADN) ou cliniques (incidence de cancer ou mortalité).
- **Les données épidémiologiques** : elles concernent principalement les survivants d'Hiroshima et les travailleurs de l'industrie nucléaire. Elles représentent de grandes cohortes de plusieurs dizaines de milliers d'individus et les paramètres choisis sont généralement le risque de cancer radioinduit ou la mortalité. Toutefois, les biais statistiques sont nombreux et très peu d'études prennent en compte les sensibilités individuelles.
- **Les quelques cas cliniques isolés** : ce sont des individus soumis à une faible dose dont on a constaté une amélioration du tableau clinique. Ce type de données ne représente en totalité qu'une dizaine de cas individuels. Leur poids statistique est donc très faible et leur interprétation est souvent rendue difficile par l'absence de critères objectifs et quantitatifs pour évaluer l'état clinique.

En dépit de la variété des protocoles, une analyse systématique de ces publications a permis de mieux préciser les spécificités de l'hormésis chez l'homme et de contredire de façon rationnelle certaines idées reçues <sup>(4)</sup>:

- **Une sous-population cible :** Il apparaît que l'hormésis n'est visible que sur des cellules humaines normales, non-transformées et radiorésistantes. En d'autres termes, l'hormésis n'a pas de bénéfice pour les cellules d'individus à risque, ce qui peut relativiser l'enthousiasme des pionniers à soumettre à de faibles doses des individus malades. On peut alors parler d'un « eustress », un stress « positif », qui améliorerait encore le tableau clinique des plus radiorésistants. Toutefois, très dépendant des conditions d'expositions, l'hormésis n'est pas observable chez tous les individus radiorésistants.
- **Gamme de doses :** A partir des données *in vitro* et des données épidémiologiques, on peut affirmer que l'hormésis n'est visible que pour des doses uniques comprises entre 20 et 75 mGy quel que soit le débit de dose.
- **Effet du débit de dose :** Les données *ex vivo* et certaines données épidémiologiques montrent que l'hormésis serait aussi observé sur le long terme pour des débits de dose du même ordre de grandeur que la moyenne mondiale de radioactivité naturelle, soit entre 0.5 et 15 mSv/an avec une moyenne d'environ 3 mSv/an (en France, la moyenne est de 2.4 mSv/an environ). Là encore, cette conclusion est en complète contradiction avec l'hypothèse de certains pionniers que l'hormésis ne concernerait que les zones du monde où l'irradiation naturelle est la plus élevée (supérieure à 15 mSv/an) (Kerala en Inde ou Ramsar en Iran).

### **L'hormésis : vers un début d'explication mécanistique ?**

Pour un radiobiologiste, une gamme de dose [20 – 75 mGy] a une signification très précise chez l'homme. En effet, une dose de 1 Gy produit simultanément 10000 dommages de bases (DB), 1000 cassures simple-brin (CSB) et 40 cassures double-brin (CDB) dans un noyau cellulaire d'un fibroblaste humain radiorésistant. Si l'on néglige l'effet des DB, [20 – 75 mGy] correspond donc théoriquement à l'absence ou la quasi-absence de CDB induites par les radiations et à moins d'une centaine de CSB. Ce stress est comparable (voire inférieur) aux taux

de dommages spontanés que l'on peut observer sur des cellules radorésistantes *en l'absence* de toute irradiation. A l'inverse, pour les cellules radiosensibles, notamment celles issues d'individus prédisposés au cancer, une telle gamme de dose produit directement ou indirectement des CDB liées à l'hyper-recombinaison en plus des dommages spontanés liés à l'environnement qui peuvent être nombreux pour ce type de cellules instables.

Dans nos articles précédents, nous avons évoqué un modèle mécanistique de la réponse individuel basé sur le transit du cytoplasme au noyau d'une protéine majeure de la signalisation et de la réparation de l'ADN, la protéine ATM (Figure 1). En effet, à partir de l'une des plus grandes collections de cellules humaines radiosensibles (collection appelée COPERNIC), notre groupe a mis en évidence que la vitesse du transit d'ATM du cytoplasme au noyau après irradiation conditionne la réponse individuelle aux radiations <sup>(10,11)</sup>. Les protéines ATM sont sous formes dimériques dans le cytoplasme. L'irradiation crée un stress oxydant qui les monomérisent d'une façon dépendante de la dose. Les monomères d'ATM, moins lourds que les dimères, peuvent alors diffuser dans le noyau <sup>(10,11)</sup>. Une fois dans le noyau, les monomères d'ATM, actifs, stimulent la réparation des CDB par suture et inhibe la réparation fautive par recombinaison. Dans le cas de cellules radiosensibles, les monomères d'ATM restent piégés dans le cytoplasme en s'associant à des protéines mutées surexprimées, caractéristiques des syndromes génétiques associés à une forte prédisposition au cancer et/ou une réaction tissulaire anormale aux radiations <sup>(12)</sup>. Or, si pour une dose comprise entre 20 et 75 mGy, il n'y a pas de CDB induites, il y a un flux de plusieurs milliers de monomères d'ATM qui diffusent très vite dans le noyau. Cet apport inattendu de monomères d'ATM pourrait permettre à la cellule de réparer des dommages spontanés (CDB ou CSB). Ainsi, cette « détoxification » des cellules permettrait de réduire les éventuels risques de cancer ou de vieillissement liés aux dommages spontanés. Cet effet ne pourrait pas se produire dans les cellules radiosensibles puisqu'au contraire, une telle gamme de dose induirait des dommages supplémentaires que l'apport des monomères d'ATM n'arriverait pas à compenser. Le phénomène d'hormésis aurait donc un sens moléculaire. Mais à quelles réelles conséquences cliniques une tel « eustress » pourrait-il aboutir ? (Figure 1).

Suivant le paramètre biologique utilisé, l'hormésis peut ne pas être mesurable. Par exemple, quand on choisit le nombre de CDB non-réparées comme paramètre, l'hormésis ne peut être mis en évidence que si la dose hormétique ne produit pas de CDB et réduit significativement le nombre de CDB spontanées, à condition qu'il y en ait dans la cellule. Cet exemple montre une fois encore que le phénomène d'hormésis n'est pas systématiquement observé sur toutes les cellules radorésistantes, dans toutes les conditions expérimentales et avec

n'importe quel paramètre. Dans le cas particulier des études épidémiologiques, c'est le risque de cancer radio-induit qui est le plus fréquemment utilisé comme paramètre. Aux doses hormétiques, le risque peut devenir négatif c'est-à-dire qu'il devient inférieur au risque de cancer spontané (sans irradiation). Cependant, pour des individus au risque de cancer spontané déjà très faible, l'hormesis pourrait ne pas être mesurable non plus.

En dépit de ces limites de mesurabilité, on notera que la gamme de dose [20 – 75 mGy] dans lequel l'hormesis a été observé est déduite à la fois des expériences *in vitro* et des données épidémiologiques, c'est-à-dire à partir de protocoles indépendants, ce qui renforce donc l'existence de ce phénomène. Comment l'hormesis s'inscrit-il dans l'estimation du risque radioinduit global?

### **L'hormésis et l'hypersensibilité aux faibles doses : deux phénomènes contraires pour expliquer l'évolution du risque radioinduit**

Dans un article précédent traitant du phénomène d'hypersensibilité aux faibles doses (HFD) <sup>(13)</sup>, nous avons montré qu'une faible dose généralement comprise entre 100 et 800 mGy (c'est-à-dire 10 fois plus que pour l'hormesis) pouvait produire des effets comparables à 2 à 10 fois la dose initiale : excès de mort cellulaire ou excès de mutations <sup>(13)</sup>. L'effet HFD maximal est généralement observé à 200 mGy. De façon intéressante, à l'inverse de l'hormesis, le phénomène HFD ne s'observe que sur des cellules radiosensibles et est absent dans les cellules radorésistantes.

Rappelons le mécanisme proposé pour le phénomène HFD dans le cadre du modèle de transit d'ATM. Entre 100 et 800 mGy, la dose est suffisante pour apporter plusieurs CDB à la cellule. Or, le nombre de monomères d'ATM est lui aussi important : dans les cellules radorésistantes, la faible augmentation du nombre de CDB est compensée par l'apport massif des monomères d'ATM et les CDB sont réparées dans une relation dose-effet continue. Ainsi, le phénomène d'HFD n'est pas observé chez les cellules radorésistantes <sup>(12)</sup>. A l'inverse, dans les cellules radiosensibles, ce même flux de monomères d'ATM est retardé voire empêché dans sa course vers le noyau : des CDB resteront donc non-reconnues voire non-réparées ou mal-réparées, exactement comme si la cellule avait été irradiée à une dose plus forte <sup>(12)</sup> (Figure 1). En conclusion, tous les deux expliqués par le modèle du transit d'ATM, les phénomènes d'hormesis et HFD sont observés à des gammes de doses clairement différentes sur des individus, radorésistants pour l'hormesis ou bien radiosensibles pour HFD <sup>(4)</sup> : que devient alors le risque radioinduit si une population rassemble à la fois des individus radiosensibles HFD-positifs et des individus radorésistants hormesis-positifs ? On s'attendrait logiquement à

voir un pic d'excès de risque dans la gamme [100 – 800 mGy] et un pic de diminution de risque dans la gamme [20 – 75 mGy]. Toutefois, cette observation resterait conditionnée par l'importance des sous-populations concernées. De façon intéressante, sur certaines données issues des survivants d'Hiroshima, on peut voir effectivement que le risque de cancer est légèrement plus élevé dans des doses de l'ordre de 100-200 mGy alors qu'il est nul voire négatif pour des doses de l'ordre de 25 mGy. Même si ces interprétations permettent d'affiner l'évaluation du risque de cancer radioinduit, il faut rester prudent et continuer à accumuler les données sur les expositions aux faibles doses (Figure 2).

Considérant la gamme de dose [20 – 75 mGy] dans laquelle l'hormésis peut être observé, il est logique de s'interroger sur l'occurrence de ce phénomène après une exposition au scanner. Là encore, il faut rester prudent car, dans le cadre thérapeutique et la majorité des scanners diagnostiques (accidents traumatiques mis à part), les patients soumis au scanner peuvent souffrir de pathologies qui sont rarement associées à une réponse normale aux radiations (ex : cancers, maladies neurodégénératives, ...). De plus, l'usage des produits de contraste pendant l'examen scanographique peut également augmenter la dose biologique, notamment le nombre de CDB non-réparées et faire ainsi disparaître l'hormésis<sup>(14)</sup>. Ainsi, il est peu probable que des phénomènes hormétiques puissent être *systématiquement* induits par des scanners. Encore une fois, il faudra mieux documenter les expositions aux faibles doses et, pour ce faire, une plus grande collaboration entre radiologues et radiobiologistes doit être envisagée.

## **Conclusions**

L'hormésis (c'est-à-dire un effet bénéfique pour la cellule, le tissu ou l'individu après une irradiation) est donc bien un phénomène observé expérimentalement mais celui-ci survient dans des conditions très spécifiques : sur des cellules ou des individus plutôt radiorésistants, après une dose unique située entre 20 et 75 mGy, avec des paramètres biologiques ou cliniques spécifiques qui permettent les valeurs négatives (ex : risque de cancer et non le taux de CDB non-réparées). Ces conditions d'observations sont très restrictives et ne correspondent en rien avec l'interprétation de certains chercheurs qui est généralement diffusée depuis des dizaines d'années en faisant de l'irradiation à faibles doses un bénéfice certain pour l'homme. L'hormésis se distingue du phénomène de réponse adaptative par le fait que ce dernier est lié à la succession de 2 doses (une faible puis une forte dose) et de l'hypersensibilité aux faibles doses qui survient sur des cellules ou des patients radiosensibles dans une gamme de doses environ 10 fois plus élevées. Tout comme la réponse adaptative et l'hypersensibilité aux faibles doses, l'hormésis trouve aujourd'hui une explication mécanistique dans le modèle de transit de

la protéine ATM. Il correspond en effet à une dose d'irradiation qui n'induit pas de CDB, peu de CSB mais dont l'apport de monomères ATM au noyau permet de favoriser la réparation de cassures de l'ADN spontanées et donc d'en diminuer les conséquences. Afin de mieux définir quelles sous-populations d'individus radiorésistants pourraient montrer ce phénomène et surtout dans quelles conditions d'expositions on pourrait systématiquement l'observer, une accumulation massive de données nouvelles sur les faibles doses de radiation sont encore nécessaires.

## Bibliographie

1. Lefebvre T, Raynal C. Les métamorphoses de Tho-Radia : Paris-Vichy. Paris, France: Glyphe; 2013.
2. Améon R. Le radon dans les stations thermales : une source d'exposition aux rayonnements ionisants. *Radioprotection*. 2003;38:201-15.
3. Zwelling LA, Michaels S, Erickson LC, Ungerleider RS, Nichols M, Kohn KW. Protein-associated deoxyribonucleic acid strand breaks in L1210 cells treated with the deoxyribonucleic acid intercalating agents 4'-(9-acridinylamino) methanesulfon-m-anisidide and adriamycin. *Biochemistry*. Nov 10 1981;20(23):6553-63.
4. Devic C, Ferlazzo ML, Berthel E, Foray N. Influence of individual radiosensitivity on the hormesis phenomenon: towards a mechanistic explanation based on the nucleoshuttling of ATM protein. Dose-response : a publication of International Hormesis Society. 2020;in press.
5. US Senate - Senate Environment and Public Works Subcommittee. Hearings about "Oversight of the Environmental Protection Agency's Implementation of Sound and Transparent Science in Regulation -testimony E.D. Calabrese. US Senate Proceedings. 3 octobre 2018 2018.
6. Devic C, Foray N. Qu'est-ce que la réponse adaptative ? Entre vrais effets et fausses interprétations. *Docteur Imago*. 17 septembre 2018 2018.
7. Southam C, M. , Ehrlich J. Effects of Extract of western red-cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture. . *Phytopathology*. 1943;33:517-24.
8. Luckey TD. Hormesis with ionizing radiation New York, USA: CRC Press; 1980.
9. Foray N, Bourguignon M, Hamada N. Individual response to ionizing radiation. *Mutation Research Review*. 2016;770:369-86.
10. 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*. Mar 1 2016;94(3):450-60.
11. 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.
12. Berthel E, Foray N, Ferlazzo ML. The Nucleoshuttling of the ATM Protein: A Unified Model to Describe the Individual Response to High- and Low-Dose of Radiation? *Cancers*. Jun 28 2019;11(7). Epub 2019/07/03.
13. Devic C, Foray N, Bourguignon M. Pourquoi la dose biologique est-elle si différente de la dose physique ? *Docteur Imago*. 2017;22 Mars
14. Joubert A, Biston MC, Boudou C, Ravanat JL, Brochard T, Charvet AM, et al. 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*. Aug 1 2005;62(5):1486-96.
15. Preston DL, Ron E, Tokuoka S, Funamoto S, Nishi N, Soda M, et al. Solid cancer incidence in atomic bomb survivors: 1958-1998. *Radiation research*. Jul 2007;168(1):1-64. Epub 2007/08/29.

## Légende des figures

**Figure 1 :** Représentation schématique du phénomène d'hypersensibilité (HFD) aux faibles doses et de l'hormésis dans le cadre du modèle de transit de la protéine ATM. Pour HFD, une dose comprise entre 100 et 800 mGy produit quelques CDB radioinduites et un grand nombre de monomères d'ATM. Toutefois pour les cellules radiosensibles, des protéines substrats piègent ATM dans le cytoplasme et très peu de monomères d'ATM diffusent dans le noyau pour déclencher la réparation des CDB. Quelques heures après l'irradiation, de nombreuses CDB restent non réparées comme si les cellules avaient été irradiées en des doses plus fortes. Pour l'hormésis, une dose comprise entre 20 et 75 mGy ne produit pas de CDB mais un grand nombre de monomères d'ATM. Dans les cellules radorésistantes, les monomères d'ATM peuvent déclencher la réparation des CDB spontanées, ce qui peut diminuer le risque de cancer ou de vieillissement accéléré.

**Figure 2 : Risque de radioinduit en fonction de la dose. A.** Risque des cancers solides des survivants du bombardement d'Hiroshima tiré de <sup>(15)</sup>. On remarque vers 200 mGy un excès de risque alors qu'entre 20 et 75 mGy, un risque nul voire négatif est présenté. **B.** Représentation schématique de l'effet biologique où peuvent être observés l'hormésis sur des cellules radorésistantes entre 20 et 75 mGy (pas de CDB radioinduites), le phénomène HFD sur des cellules radiosensibles entre 200 et 800 mGy. Pour des doses supérieures, l'effet biologique est proportionnel à la dose jusqu'à une valeur où les systèmes de signalisation et de réparation des CDB sont saturés.

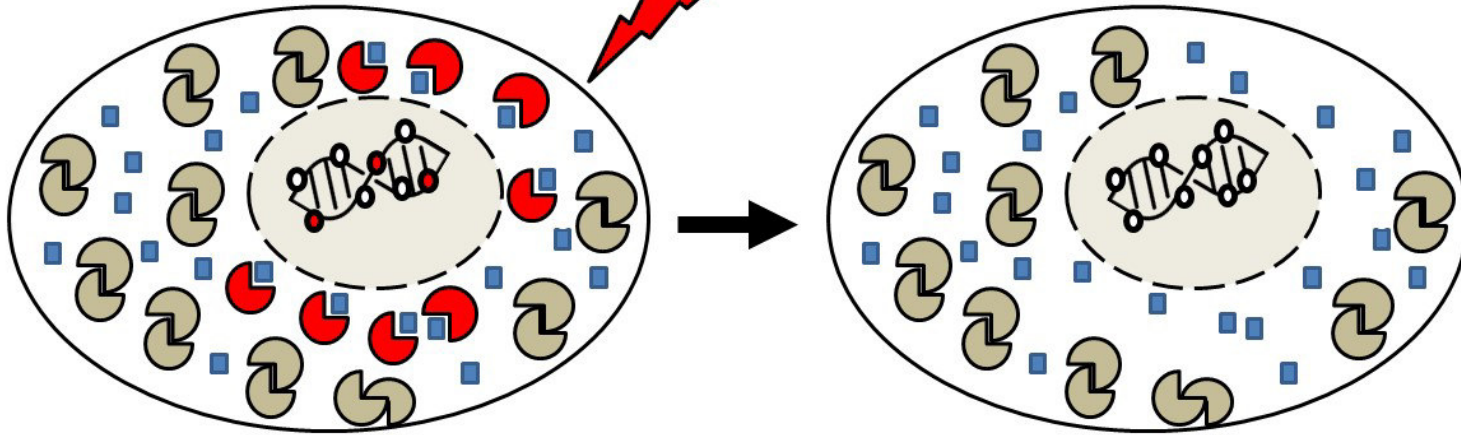
Solid cancer dose response from Hiroshima bomb survivors reproduced from the figure 1 of with permission. Age-specific cancer rates over the 1958-1994 follow-up period relative to those for an unexposed person, averaged over the follow-up and over sex, and for age at

exposure 30. The dashed curves represent  $\pm$  standard error for the smoothed curve. The straight line is the linear risk estimate computed from the range 0-2 Sv. Because of apparent distinction between distal and proximal zero-dose cancer rates, the unity baseline corresponds to zero-dose survivors with 3 km of the bombs. The horizontal dotted line represents the alternative baseline if the distal survivors were not omitted. The inset shows the same information for the fuller dose range <sup>(15)</sup>



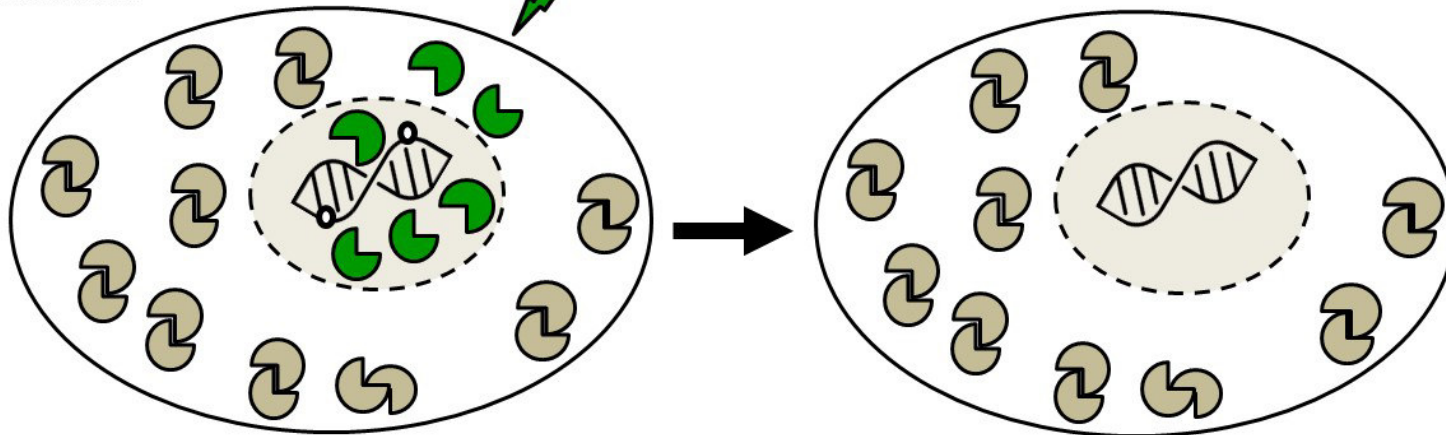
Hypersensibilité  
aux faibles doses (HFD)

100-800 mGy



Hormésis

20-75 mGy



Dimère d'ATM



Monomère d'ATM

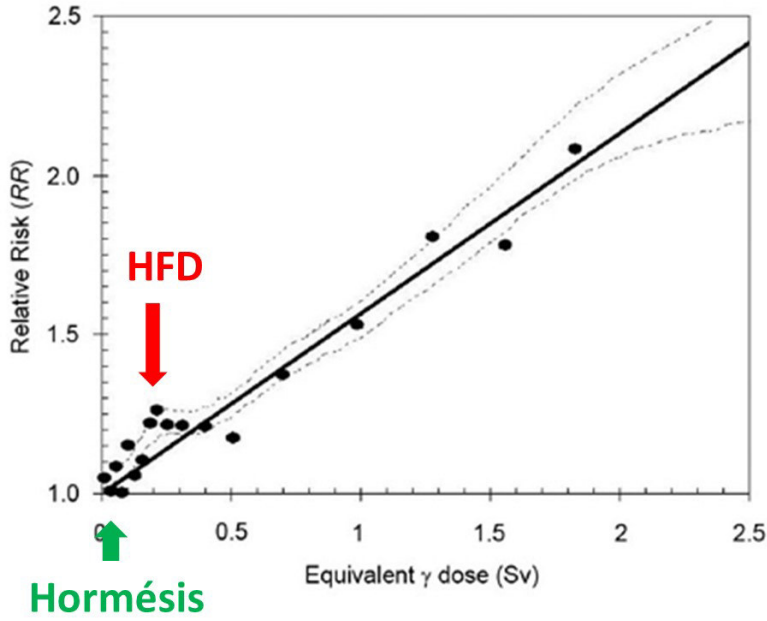
■ Substrat d'ATM

● CDB spontanée

● CDB radioinduite

Figure 1

**A**



**B**

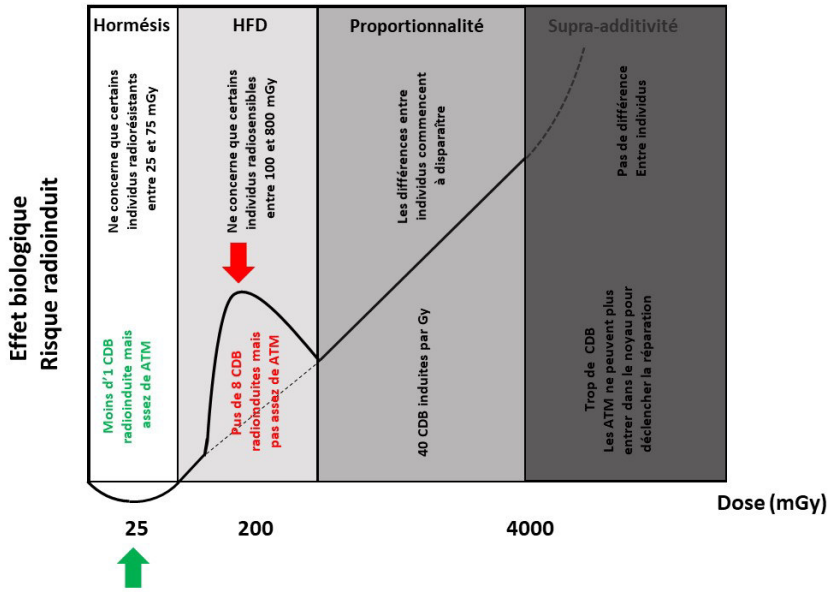


Figure 2

**Figure 1 : Représentation schématique des principaux effets radiobiologiques.** Il est à noter que l'hormesis est un effet de dose (ou débit de dose) unique alors que la réponse adaptative est un effet dû à une succession de doses

**Figure 2 : Théorie du transit d'ATM et réponse adaptative : A la suite d'une exposition à une dose  $d_{RA}$  des monomères d'ATM diffusent dans le noyau. Après une période de temps  $\Delta t_{RA}$ , un excès de monomères d'ATL subsiste dans le noyau. Si les cellules sont exposées à une forte dose  $D_{RA}$ , de nombreux monomères d'ATM sont produits auxquels s'ajoute l'excès de monomères (bleus) produits par  $d_{RA} + \Delta t_{RA}$  qui contribuent à réduire l'effet de  $D_{RA}$ . L'effet  $d_{RA} + \Delta t_{RA} + D_{RA}$  est donc dans ce cas inférieur à l'effet produit par la dose  $D_{RA}$  seule.**



## **Abstract**

### **Cassures double-brin de l'ADN et influence du facteur individuel dans la réponse aux faibles doses de radiation : cas particulier des examens par scanner.**

Les faibles doses de radiation constituent un enjeu sociétal important, notamment pour l'estimation des risques potentiellement liés aux expositions médicales. En effet, la dose délivrée pendant des examens de radiodiagnostic a plus que doublé en 10 ans. L'évaluation du risque radioinduit est toutefois rendue difficile par la variété des protocoles d'irradiation (dose par séance, dose cumulée, débit de dose, type de radiation), le manque de sensibilité des dispositifs dosimétriques et le manque de connaissance des effets biologiques spécifiques des faibles doses comme l'hypersensibilité aux faibles doses (HFD), la réponse adaptative (RA) et l'hormésis. De plus, il apparaît aujourd'hui que le facteur individuel peut influencer significativement la réponse biologique et clinique aux radiations.

Dans le cadre de cette thèse, afin de mieux évaluer le risque individuel lié aux faibles doses de radiation dans un contexte de radiodiagnostic médical, nous avons conjugué les savoir-faire de deux structures : la société Fibermetrix qui apporte une technologie nouvelle de dosimètres physiques basés sur la fibre optique et l'Unité Inserm UA8 « Radiations : Défense, Santé, Environnement » dont les modèles mécanistiques développés sur des données humaines permettent aujourd'hui de mieux comprendre certains effets radiobiologiques. En particulier, nous proposons d'exposer une collection de fibroblastes, astrocytes et cellules mammaires humaines à des conditions d'examens scanographiques classiques (examen du cerveau ou du thorax), et d'en mieux comprendre les effets biologiques spécifiques en utilisant l'immunofluorescence et des biomarqueurs de la réparation et de la signalisation des cassures double-brin de l'ADN (CDB).

Après avoir proposé un modèle mécanistique basé sur le transit radioinduit de la protéine ATM du cytoplasme au noyau pour les 3 effets radiobiologiques spécifiques des faibles doses (HFD, RA et hormésis), l'analyse par immunofluorescence des données issues des irradiations scanographiques montrent que celles-ci produisent un excès de CDB pour des cellules issues de patients radiosensibles ou prédisposés au cancer ou au vieillissement et qu'elles stimulent différemment l'arrivée de protéines ATM fonctionnelles dans le noyau. Dans le même temps, le dispositif IVISCAN de Fibermetrix a permis une évaluation plus précise de la dose. Cette approche a abouti à une évaluation du risque dans chaque condition testée, une définition des statuts génétiques à risque pour les faibles doses et des recommandations sur la façon de pratiquer des analyses de risque des patients irradiés.