



HAL
open science

Effets secondaires de la radiothérapie conventionnelle et de la protonthérapie sur les tissus sains : biomarqueurs sanguins et tissulaires

Samia Chaouni

► To cite this version:

Samia Chaouni. Effets secondaires de la radiothérapie conventionnelle et de la protonthérapie sur les tissus sains : biomarqueurs sanguins et tissulaires. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2020. Français. NNT : 2020NORMC416 . tel-03476075

HAL Id: tel-03476075

<https://theses.hal.science/tel-03476075>

Submitted on 12 Dec 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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat
Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Effets secondaires de la radiothérapie conventionnelle et de la protonthérapie sur les tissus sains : biomarqueurs sanguins et tissulaires

Présentée et soutenue par
Samia CHAOUNI

Thèse soutenue publiquement le 11/12/2020
devant le jury composé de

Mme CLAUDIA FOURNIER	Professeur, GSI Helmholtz	Rapporteur du jury
Mme CÉLINE MIRJOLET	Maître de conférences, praticien hosp., Centre Georges François Leclerc	Rapporteur du jury
Mme CATHERINE GHEZZI	Professeur des universités, Université Grenoble Alpes	Membre du jury
M. JEAN-LOUIS HABRAND	Professeur des universités PraticienHosp, Université Caen Normandie	Président du jury
Mme CARINE LAURENT	Chargé de recherche, Université Caen Normandie	Membre du jury
M. MARC ANDRE MAHE	Professeur des universités PraticienHosp, Université Caen Normandie	Membre du jury
M. FREDERIC POUZOLET	Responsable, Institut Curie Paris	Membre du jury
M. FRANCOIS SICHEL	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Directeur de thèse

**Thèse dirigée par FRANCOIS SICHEL, Aliments bioprocédés toxicologie
environnements**



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



Normandie de Biologie Intégrative,
Santé, Environnement



UR ABTE
EA-4651
Aliments Bioprocédés
Toxicologie Environnements

TITRE :

**Effets secondaires de la radiothérapie conventionnelle et de la protonthérapie sur les
tissus sains : biomarqueurs sanguins et tissulaires**

Présentée par : Samia CHAOUNI

11/12/2020

Composition du jury :

Président	Pr Jean-Louis Habrand, Département de Radiothérapie, CLCC Baclesse (Caen)
Rapporteur	Pr Claudia Fournier, Directrice du groupe « Immune System and tissue radiobiology », Département de Biophysique, GSI (Darmstadt)
Rapporteur	Dr Céline Mirjolet, Département de Radiothérapie, CLCC Leclerc (Dijon)
Examineur	Pr Marc-André Mahé, Directeur du CLCC Baclesse (Caen)
Examineur	Pr Catherine Ghezzi, Directrice de l'UMR UGA-INSERM 1039 « Radiopharmaceutiques Biocliniques", Faculté de Médecine de Grenoble
Examineur	Dr Frédéric Pouzoulet, Responsable de la plateforme RadeXp, Institut Curie, Université Paris-Saclay (Orsay)
Directeur de thèse	Pr François Sichel, Directeur de l'Unité ABTE-EA4651, Université de Caen-Normandie
Encadrante de thèse	Dr Carine Laurent, Responsable de l'axe « Toxicité liée à l'Irradiation des Tissus Sains », SAPHYN/Unité ABTE-EA4651, Université de Caen-Normandie

A mes parents

A ma chère et tendre mamie partie trop tôt ...

« La persévérance c'est ce qui rend l'impossible possible, le possible probable et le probable réalisé » Robert Half

Remerciements

Pour cette partie, je souhaite prendre le temps qu'il faut pour remercier chaque personne en espérant n'avoir oublié personne..

*Je tiens tout d'abord à remercier mes deux rapporteurs, le **Pr. Claudia Fournier** et le **Dr. Céline Mirjolet** de m'avoir fait l'honneur de juger ce manuscrit de thèse.*

*Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance aux autres membres du jury qui ont accepté d'examiner mon travail de thèse, le **Pr. Marc-André Mahé**, le **Pr. Jean-Louis Habrand**, et le **Dr. Frédéric Pouzoulet**.*

*Je tiens à remercier très chaleureusement le **Pr. Catherine Ghezzi** qui a également accepté de faire partie du jury c'est un honneur pour moi. Vous êtes la personne à qui je dois ma première expérience dans ce monde de la recherche. Vous étiez d'abord mon professeur de physiologie à l'université Grenoble Alpes puis tutrice de stage lors de mon stage au sein de votre laboratoire et enfin la petite bougie qui a illuminé mon chemin pendant les moments sombres ; vous savez ô combien les débuts furent difficiles et vous avez cru en moi, m'avez guidée et soutenue durant toutes ces années en France dans les moments de doutes et d'interrogations.*

*Je souhaite remercier le **Pr. François Sichel**, directeur de thèse, de m'avoir accueilli au sein de l'unité ABTE (Aliments Bioprocédés Toxicologie et Environnement), d'avoir accepté de diriger cette thèse et pour toute la confiance que tu m'as accordé pour la réalisation des enseignements au sein de l'UFR de pharmacie ainsi que pour tes relectures avisées.*

*Je tiens à remercier chaleureusement le **Dr. Carine Laurent**, encadrante de thèse. Les mots ne me suffiront jamais assez pour te remercier de m'avoir permis de passer ces 3 années de thèse dans de très bonnes conditions. Je te remercie pour tes encouragements ainsi que pour tout l'accompagnement que tu m'as accordé de près ou de loin quand j'étais en déplacement et pour m'avoir poussé vers l'avant pour la réalisation de nombreuses formations ainsi qu'à la participation à de nombreux congrès nationaux et internationaux. Grâce à toi, j'ai découvert ce monde merveilleux de la radiobiologie. Merci pour ta rigueur et toute la confiance que tu m'as accordé ainsi que pour toutes les corrections méticuleuses et tes remarques qui m'ont été très utiles. Merci également pour ton soutien pendant la période du confinement.*

Mes remerciements vont,

*Aux collaborateurs du Centre François Baclesse, le **Dr. Delphine Lecomte** et le **Dr. Dinu Stefan** pour l'inclusion des patients pour notre étude clinique ainsi que tout le personnel du **service de la recherche clinique**.*

*Aux collaborateurs de l'institut Curie, **Dr. Frédérique Megnin-Chanet, Dr. Frédéric Pouzoulet** et le **Dr. Ludovic de Marzi**. Merci pour votre accueil et pour tous les échanges fructueux que nous avons eu autour des différents projets. Merci également à **M^{me} Dalila Labiod** pour les prélèvements des souris.*

*Mes remerciements vont également aux collègues de **l'équipe ToxEMAC** pour leur gentillesse et leur accueil très chaleureux et surtout les membres de la « cellule bien être », **Dr. Stéphanie Gente, Dr. Virginie Catherine, Dr. Carine Laurent, Dr. Alexandre Leduc** pour tous les bons moments partagés ensemble hors labo que ce soit en famille à Caen, à Saint-Léger-Dubosq et bientôt au Tronquay ou encore pendant nos déjeuners mais également pour l'organisation des sessions Zoom « papotages » pendant le confinement.*

*Au **Dr. Mathilde Lechevrel**, maître de conférences en toxicologie, ce fut un réel plaisir d'avoir été en binôme avec toi pour la réalisation des travaux pratiques au sein de l'UFR de pharmacie mais également d'avoir partagé le bureau avec toi pendant quelques mois. Merci pour ton petit mail qui m'a fait énormément plaisir pendant la période du confinement.*

*A **M^{me} Maryline Guillamin**, technicienne de la plateforme de cytométrie, merci pour ta gentillesse et de m'avoir transmis et partagé tes connaissances sur la cytométrie avec beaucoup de pédagogie. Je suis devenue une pro des billes !*

*Aux anciens doctorants : **Adeline C., Antoine D et Quentin A** pour toutes les sorties et soirées que nous avons organisées ensemble et je tiens à souhaiter beaucoup de succès aux nouveaux **Antoine G et Carine El et Ilham B**.*

*A tous les stagiaires que j'ai pu croiser au laboratoire ou avec lesquels j'ai pu travailler sur mon projet : **Rebecca C, Nadira I, Violette G, Emilien E, Axel C...***

*A **M^r Najib Fathi**, mon premier maître de stage au laboratoire de microbiologie à l'office nationale de l'eau potable à Rabat. Je te remercie infiniment pour toutes les techniques et gestes de bases que tu m'as appris ainsi que pour toute la confiance que tu m'as accordée. Grâce à toi, la paillasse n'a plus de secret pour moi que ce soit pour mon organisation ou pour travailler dans des conditions stériles sous bec Bunsen, PSM ou autres.*

*A ma chère et tendre meilleure amie, **Zineb Al**, cette année 2020 coïncide avec nos 20 ans d'amitiés. Merci pour tous les week-ends, fêtes et repas partagés avec toi et tes adorables petits Samy et Elyass sur Paris. Merci pour toute ta générosité, ta joie de vivre et ton amour sincère envers moi.*

*Je tiens à remercier très tendrement **Kawtar B**, mon binôme de choc, la plus douce et la plus adorable des vétérinaires. Le hasard a bien fait de nous faire nous rencontrer dans une période critique pour nous deux. Merci à toi pour toute la motivation et toute l'énergie positive que tu dégages. Ton soutien fut considérable durant toute cette période de rédaction soit au travers des vidéos, audios que tu*

m'envoyais quotidiennement ou durant nos séances Zoom de danse et de sport. Ta rencontre est le meilleur cadeau que j'ai eu en cette année pandémique. J'ai appris de toi beaucoup de choses notamment sur le dépassement de soi et la positive attitude. J'ai hâte de faire avec toi « Agadir Oufella » à pied !

*A toutes les personnes qui m'ont soutenue de près ou de loin **Raghda B & Brahim T, Ghita S, Lucie A, Chourouk M, Nadia B, Nadia C, Noussaiba B, Hanae Z et Said El.** J'ai un peu « disparu » ces derniers temps et j'ai hâte que l'on puisse se retrouver très prochainement.*

Mes remerciements vont également à toute ma famille paternelle et maternelle du plus petit au plus grand.

*A mon cher oncle **Redouane Barzi**, le premier Dr de la famille, je te rejoins dans ce titre ^^, tu es également passé par ce chemin et tu sais à quel point des fois c'est très « chiant ». Merci pour ton écoute, ton partage d'expérience et tes précieux conseils qui m'ont été d'une grande utilité durant ce long parcours.*

*A ma chère sœur **Salma**, j'ai appris de toi le courage et la ténacité tu es un symbole de force pour moi. Je te souhaite beaucoup de bonheur ainsi que la concrétisation de tous tes projets futurs.*

*A mon frère **Mehdi**, le plus doux et le plus adorable des frères. Merci pour ton soutien et ta joie de vivre, tu deviendras un expert-comptable hors norme.*

*A ma chère sœur **Houda**, ma « coloc » de Grenoble et ensuite de Caen. Merci pour ton soutien moral et ta présence quotidienne tout au long de ce parcours. Nous avons passé de très bons moments ensemble qui seront gravés à jamais dans nos mémoires. Tu es la personne qui m'a le plus écoutée et qui m'a soutenue et suivie pas à pas dans la concrétisation de ce projet, merci ! Je suis toujours admirative de ta détermination et de ton affermissement dans un domaine fortement masculinisé. Je compte sur toi pour la construction de ma maison ^^.*

*Le meilleure pour la fin, une petite mention spéciale **à mes parents** qui me soutiennent moralement et m'apportent des bouffées d'oxygène au quotidien au-delà des 2000 kms qui nous séparent et sans qui je ne serais probablement jamais arrivée à ce que je suis aujourd'hui. Merci de nous avoir toujours poussés à faire des études et d'avoir aussi accepté l'éloignement géographique afin qu'on puisse effectuer nos études dans de grandes universités européennes. Vos encouragements emplis de fierté me font pousser des ailes et me donnent la force de me battre, de réaliser et d'entreprendre ce que je veux. Cette année « Covid » fut très très dure pour vous et pour moi, j'espère qu'on va pouvoir bientôt se réunir et partager de bons moments ensemble.... Je vous aime beaucoup.*

Enfin merci à tous ceux qui ont cru en moi et qui ont contribué à la réussite de cette thèse par leur soutien et leurs encouragements... Merci !

TABLE DES MATIERES

ABBREVIATIONS	8
COLLABORATIONS & FINANCEMENTS	9
INTRODUCTION	10
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	11
CHAPITRE 1. LES RAYONNEMENTS IONISANTS ET LEUR UTILISATION EN CLINIQUE	12
1. LES EFFETS BIOLOGIQUES DES RAYONNEMENTS IONISANTS	12
1.1. LES EFFETS DIRECTS ET INDIRECTS DES RAYONNEMENTS IONISANTS	12
1.1.1. Les effets directs	13
1.1.2. Les effets indirects	13
1.2. LES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE ET DE L'AZOTE	14
1.2.1. L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$)	15
1.2.2. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	15
1.2.3. Le radical hydroxyle (OH^\bullet)	15
1.2.4. Les espèces réactives de l'azote	16
1.3. LES LESIONS RADIO-INDUITES DES MACROMOLECULES BIOLOGIQUES	16
1.3.1. Les dommages à l'ADN	16
1.3.2. Les lésions des lipides	19
1.3.3. L'oxydation des protéines	20
1.4. LES REPONSES CELLULAIRES AUX RAYONNEMENTS IONISANTS	20
1.4.1. Les systèmes de défenses antioxydantes	21
1.4.2. La régulation du cycle cellulaire	23
1.4.3. Les mécanismes de réparation des macromolécules biologiques	27
1.4.4. La mort cellulaire induite par les rayonnements ionisants	30
2. LA RADIOTHERAPIE CONVENTIONNELLE ET LA PROTONTHERAPIE	34
2.1. LES GRANDS PRINCIPES DE LA RADIOTHERAPIE	34
2.1.1. La radiosensibilité intrinsèque	34
2.1.2. L'administration de la dose	35
2.1.3. La qualité du rayonnement	37
2.1.4. L'effet oxygène	37
2.1.5. Le cycle cellulaire	38
2.2. INTERET DE LA PROTONTHERAPIE	38
2.2.1. La précision balistique des protons	39
2.2.2. Le TEL et l'EBR des protons	39
2.2.3. Les clusters de lésions de l'ADN induits par les protons	40
2.2.4. L'effet oxygène en PT	42
2.2.5. L'hypofractionnement de la PT	43
2.2.6. Application en clinique	43
2.3. GENERATION ET DELIVRANCE DES FAISCEAUX DE PROTONS	44
2.3.1. La diffusion passive : Double Scattering (DS)	45
2.3.2. Le balayage du faisceau : Pencil Beam Scanning (PBS)	45
CHAPITRE 2. LES EFFETS SECONDAIRES DE LA RADIOTHERAPIE SUR LES TISSUS SAINS	46
1. ORGANISATION DES TISSUS SAINS	46
1.1. LES TISSUS COMPARTIMENTAUX	46

1.2. LES TISSUS NON-COMPARTIMENTAUX	46
2. LES EFFETS SECONDAIRES	47
2.1. LES EFFETS TISSULAIRES PRECOCES	47
2.2. LES EFFETS TISSULAIRES TARDIFS	49
2.3. FOCUS SUR LES EFFETS SECONDAIRES AUX POUMONS, AU CŒUR ET A LA PEAU	51
2.3.1. Les effets secondaires pulmonaires	52
2.3.2. Les effets secondaires cardiaques	53
2.3.3. Les effets secondaires cutanés	53
3. LA TOXICITE DE LA PROTONTHERAPIE AUX TISSUS SAINS	54
3.1. LA TOXICITE DE LA PROTONTHERAPIE EN CLINIQUE	54
3.2. LES LIMITES DE LA PROTONTHERAPIE	55
4. LES BIOMARQUEURS D'EFFETS SECONDAIRES ET DE RADIOSENSIBILITE	61
<u>OBJECTIFS DE LA THESE</u>	<u>66</u>
<u>RESULTATS</u>	<u>69</u>
ARTICLE 1 : THE POSSIBILITY OF USING GENOTOXICITY, OXIDATIVE STRESS AND INFLAMMATION BLOOD BIOMARKERS TO PREDICT THE OCCURRENCE OF LATE CUTANEOUS SIDE EFFECTS AFTER RADIOTHERAPY	70
ARTICLE 2 : SIDE EFFECTS OF SCATTERED <i>VERSUS</i> SCANNED PROTON BEAMS ON NORMAL TISSUES IN TOTAL BODY IRRADIATED MICE: SURVIVAL, GENOTOXICITY, OXIDATIVE STRESS AND INFLAMMATION	92
ARTICLE 3 : SKIN TRANSCRIPTOMIC STUDY IN TOTAL BODY IRRADIATED MICE EXPOSED TO SCATTERED <i>VERSUS</i> SCANNED PROTON BEAMS	120
<u>DISCUSSION GENERALE</u>	<u>150</u>
<u>CONCLUSIONS-PERSPECTIVES</u>	<u>159</u>
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	<u>163</u>
<u>ANNEXES</u>	<u>192</u>
COMMUNICATIONS	193
FORMATIONS	196
MISSION ENSEIGNEMENT	197
ENCADREMENT DE STAGIAIRES	198
ACTIVITES ADMINISTRATIVES	199

ABBREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

ATM : ataxia telangiectasia mutated

CAT : catalase

CDB : cassure double-brin

CLCC : Centre de Lutte Contre le Cancer

CPP : comités de protection des personnes

CSB : cassure simple-brin

DNA-PK : protéine kinase dépendante de l'ADN

DS : double scattering

EBR : efficacité biologique relative

ERO : espèces réactives de l'oxygène

ESPRITS : effets secondaires de la protonthérapie liés à l'irradiation des tissus sains

GPx : glutathion peroxydase

ICRU : international commission on radiation units

MAPK : mitogen-activated protein kinases

NF- κ B : nuclear factor κ B

NO° : monoxyde d'azote

ONOOH : peroxydinitrite

P53 : tumor protein 53

PAESCART : prédiction de l'apparition des effets secondaires cutanés tardifs après radiothérapie

PARP : poly(ADP-ribose) polymerase

PARPi : PARP inhibiteur

PBS : pencil beam scanning

RI : rayonnements ionisants

RT : radiothérapie

RTOG/EORTC : Radiation Therapy Oncology Group/European Organization for Research and Treatment of Cancer

SOD : superoxyde dismutase

TEL : transfert d'énergie linéique

TPS : Treatment Planning System

COLLABORATIONS & FINANCEMENTS

Ce doctorat a été effectué dans l'unité ABTE (Aliments Bioprocédés Toxicologie et Environnement)-EA4651 dirigée par le Pr François Sichel au sein de l'équipe ToxEMAC (Toxicologie de l'Environnement, Milieux Aériens et Cancers) dirigée par le Pr Christelle Monteil. L'équipe ToxEMAC est hébergée au Bâtiment Recherche du CLCC François Baclesse ainsi qu'à l'UFR Médecine-Pharmacie de Rouen. Ce projet, appartenant à l'axe 3 « TITUS » (Toxicité liée à l'Irradiation des TissUs Sains) dirigé par le Dr Carine Laurent, a été mené en collaboration avec les services de Radiothérapie, de Physique Médicale et de Recherche Clinique du CLCC François Baclesse ainsi qu'avec la plateforme RadeXP et le service de Physique Médicale de l'Institut Curie-Centre de Protonthérapie d'Orsay, l'unité INSERM U1196/UMR9187 CMIB de l'Institut Curie-Centre de Recherche à Orsay et la plateforme ABiMS (FR 2424 CNRS UPMC) à Roscoff.



Les travaux présentés ont été financés par : un RIN Doctorant (Région Normandie), un RIN Recherche (FEDER, CPIER Vallée de la Seine, Etat, Région), et le Cancéropôle Nord-Ouest.



INTRODUCTION

Ce manuscrit de thèse est organisé en 3 grandes parties :

- une étude bibliographique comprenant 2 chapitres : le premier expliquant les effets des rayonnements ionisants et leur utilisation en clinique avec un focus sur la protonthérapie et le deuxième portant sur les effets secondaires de la radiothérapie et de la protonthérapie et les biomarqueurs d'intérêt ;
- les résultats sous forme de 3 articles : le premier article publié dans *Antioxidants* en Mars 2020 sur des biomarqueurs de stress oxydatif, de génotoxicité et d'inflammation dans le sang de patients traités par RT conventionnelle et présentant ou non des toxicités cutanées tardives, le deuxième article (soumis à *Antioxidants*) portant sur les effets secondaires dans les poumons, le cœur, la peau et le sang de souris exposées à des faisceaux de protons balayés ou diffusés et le troisième article (soumis à *Scientific Reports*) qui correspond à l'étude transcriptomique au niveau de la peau de ces souris.
- la discussion générale et les conclusions & perspectives qui reprennent l'ensemble des résultats des 3 articles et les hypothèses et perspectives possibles.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1. Les rayonnements ionisants et leur utilisation en clinique

Les rayonnements ionisants (RI) transfèrent leur énergie à la matière vivante ce qui entraîne des effets biologiques affectant ainsi les cellules et tissus. C'est pour ces propriétés qu'ils sont largement utilisés en clinique, principalement en oncologie.

1. Les effets biologiques des rayonnements ionisants

Les RI agissent en 4 phases successives : immédiatement jusqu'à des années après irradiation. La phase physique se produit dans les 10^{-15} à 10^{-16} seconde après l'irradiation et correspond aux évènements physiques initiaux (ionisations, excitations) déclenchés par l'interaction des rayonnements incidents avec les atomes des molécules constituant le milieu. La phase (physico)chimique se produit dans les 10^{-5} à 1 seconde après irradiation et correspond aux

réactions chimiques conduisant à la rupture des liaisons covalentes. La phase cellulaire a lieu dans les heures qui suivent l'irradiation et correspond aux conséquences cellulaires des lésions des macromolécules biologiques. Enfin, la phase tissulaire se produit jusque des années après irradiation et correspond aux conséquences tissulaires précoces et tardives des dommages cellulaires (Figure 1).

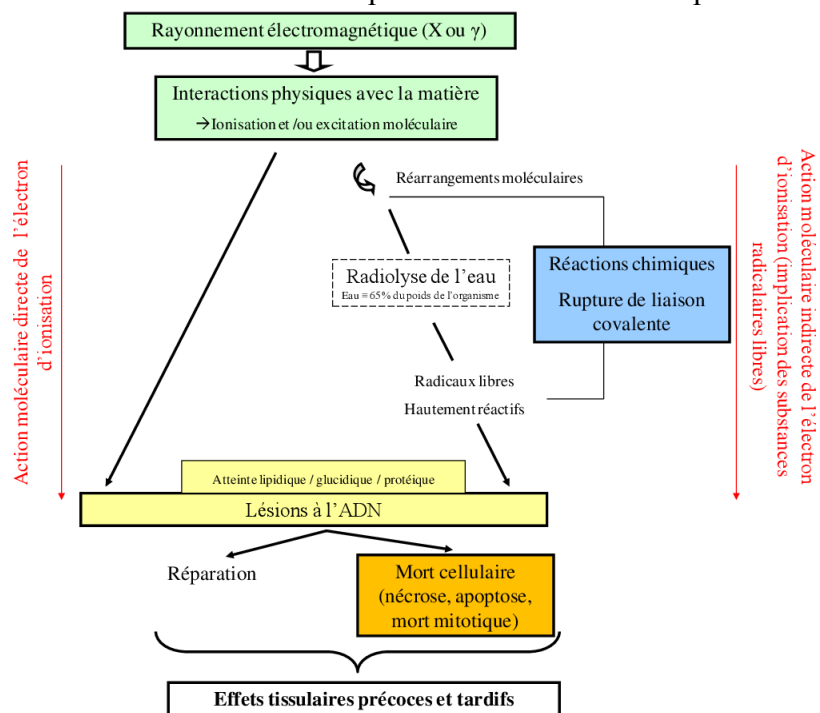


Figure 1: Schéma global de l'action des rayonnements ionisants sur la matière. D'après (Durand Christelle 2014).

1.1. Les effets directs et indirects des rayonnements ionisants

Pour qu'un rayonnement soit ionisant, il doit avoir une énergie cinétique suffisante pour arracher des électrons à la matière, c'est-à-dire au minimum 4,3 eV (énergie d'ionisation du potassium). Les rayons ionisants provoquent donc des ionisations et des excitations des atomes constituant le milieu. Ils sont à l'origine de deux types d'effets : les effets directs et les effets indirects (Figure 2).

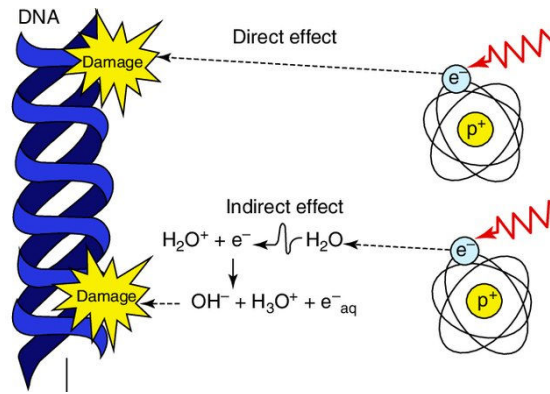


Figure 2. Effets directs et indirects des rayonnements ionisants sur la matière biologique (Moreels et al. 2020).

1.1.1. Les effets directs

Ils correspondent aux interactions directes des rayonnements avec les molécules constituant la matière vivante, dont la molécule d'ADN : excitations ou ionisations des sucres, bases, phosphates. Ces molécules sont soit ionisées si l'énergie est suffisante pour arracher un électron à l'atome, soit excitées dans le cas contraire. Ces effets sont prépondérants avec les rayonnements à haut TEL (Transfert d'Énergie Linéique) comme c'est le cas avec les hadrons. Le TEL peut être défini par le ratio $dE\Delta / dl$ où $dE\Delta$ correspond à l'énergie moyenne transférée par un RI au voisinage du matériau qu'il traverse tout au long de la distance parcourue dl . Le TEL permet ainsi de mesurer l'énergie transférée à la matière par unité de distance.

1.1.2. Les effets indirects

Ils sont principalement générés par des rayonnements de faible TEL tels que les rayonnements γ et X. La plupart des interactions de ces rayonnements avec la matière se fait par le biais de cette voie indirecte qui est considérée comme prépondérante. Les cibles principales sont alors les molécules d'eau présentes en grande quantité (65% de l'organisme) dans les cellules vivantes. Des ionisations et des excitations de la molécule d'eau se produisent générant ainsi, après plusieurs étapes successives, la production des espèces ioniques radicalaires : OH^\bullet et H^\bullet , e^-_{aq} , H^+ selon les processus décrits ci-contre (Figure 3). Ce phénomène

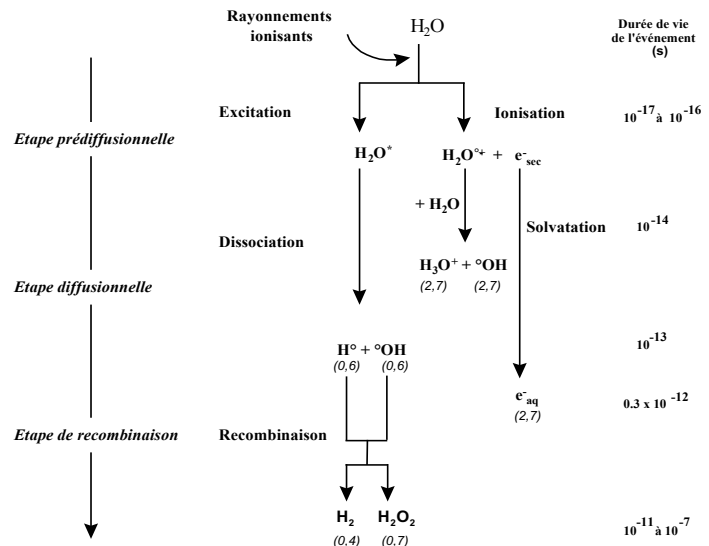


Figure 3. Radiolyse de l'eau. D'après (Land, Bensasson, et Truscott 1993).

est appelé « radiolyse de l'eau ». Par ailleurs, ces espèces ioniques radicalaires extrêmement réactives peuvent se transformer en présence d'oxygène en des espèces radicalaires plus stables appelées « Espèces Réactives de l'Oxygène » (ERO) comme l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ et le radical hydroxyle OH^{\cdot} (Migdal et Serres 2011; Ward 1988).

1.2. Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

Les ERO sont des espèces chimiques présentes dans les organismes vivants. Elles peuvent provenir du métabolisme basal des cellules : de la chaîne respiratoire mitochondriale (90% des

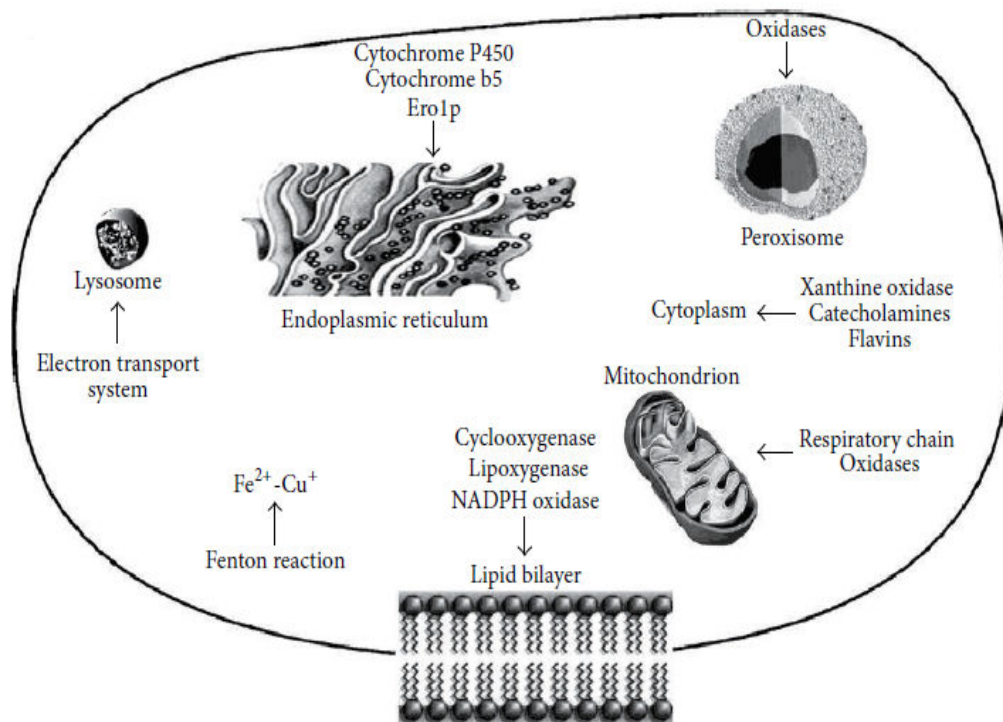


Figure 4. Les différentes sources de production d'ERO au sein des cellules (Di Meo et al. 2016).

ERO cellulaires), d'enzymes présentes dans la membrane plasmique (cyclooxygénase, lipoxygénase, NADPH oxydase), des systèmes de transport d'électrons du réticulum endoplasmique ou de la membrane nucléaire, de la β -oxydation des acides gras dans les peroxydases, ou encore des cytochromes P450. Mais elles peuvent aussi se former dans le cas d'exposition à des polluants, après consommation de médicaments ou après irradiation, principalement via la radiolyse de l'eau (Migdal et Serres 2011) (Figure 4).

Elles ont 2 rôles principaux distincts. A de faibles concentrations, elles sont impliquées dans différents mécanismes cellulaires tels que la modulation de la fonction cellulaire (différentiation, prolifération) et jouent un rôle dans les réactions inflammatoires et dans la signalisation en tant que seconds messagers. En revanche, à des concentrations plus élevées, les radicaux peuvent être néfastes et peuvent ainsi entraîner des dommages au niveau de l'ADN,

des lipides, des protéines et peuvent également avoir un rôle mitogène. Afin de s'en protéger, la cellule possède des systèmes de défense. Dans le cas où ces systèmes de défense sont dépassés ou inefficaces, un déséquilibre se produit en faveur des espèces radicalaires, il y a alors stress oxydatif, pathologique pour les cellules et tissus (Valko et al. 2006; 2007).

1.2.1. L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$)

Dérivé de l'oxygène moléculaire par addition d'un électron moléculaire, ce radical a été découvert en 1969 par Mac Cord. Sa principale source de production est la chaîne mitochondriale par le biais des complexes I et III mais peut également être produit par les cellules phagocytaires (neutrophiles, monocytes, macrophages, éosinophiles) (Goudable et Favier 1997; Valko et al. 2007). Après irradiation, il peut conduire à la peroxydation des lipides $ROO\bullet$, à la production de peroxynitrite $ONOOH$ en présence de monoxyde d'azote $NO\bullet$ ou à la formation de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 via les superoxydes dismutases SOD.

1.2.2. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Le peroxyde d'hydrogène ne possède pas d'électron célibataire, il n'est donc pas à proprement parler un radical libre. Sa stabilité lui confère la possibilité de diffuser au sein des cellules (Goudable et Favier 1997). Il est un second messager important dans différentes voies : statut redox (glutathion), NF- κ B, cascade MAPK, prostaglandine synthase, inhibition protéine phosphatase. En présence de fer, le peroxyde d'hydrogène se décompose en radical hydroxyle via la réaction de Fenton.

1.2.3. Le radical hydroxyle ($OH\bullet$)

Il est considéré comme l'espèce radicalaire la plus réactive possédant un temps de demi-vie très court de l'ordre de 10^{-9} seconde. En dehors des réactions de Fenton et d'Haber-Weiss détaillées en Figure 5, il est produit par la radiolyse de l'eau : par l'ionisation et l'excitation de la molécule d'eau (Goudable et Favier 1997; Valko et al. 2007). Il agit sur l'activation des cascades de kinases, l'oxydation des protéines, la peroxydation lipidique et l'oxydation de l'ADN.

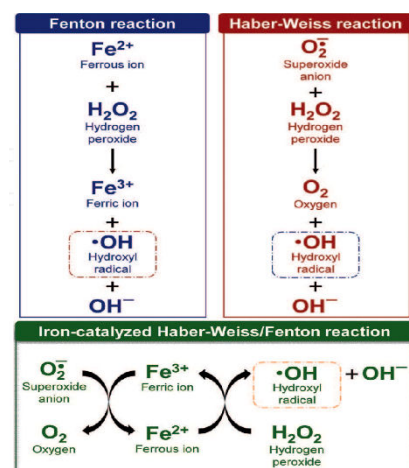


Figure 5. Réactions de Fenton et d'Haber-Weiss produisant le radical hydroxyle. D'après (Boonla 2018).

1.2.4. Les espèces réactives de l'azote

Les espèces réactives de l'azote sont, comme les ERO, présentes de manière basale dans les cellules. Le radical oxyde nitrique NO[•] est notamment responsable de divers effets aussi bien bénéfiques que délétères. Il est généré par les NO synthases (NOS) en quantité régulée. Mais sa production en plus grande quantité, amplifiée par la NOS inductible, peut aboutir à un stress oxydatif et nitrosant. Des réactions d'oxydation et de nitrosylation oxydative conduisent alors à la formation de peroxydinitrite ONOO⁻. Le peroxydinitrite est impliqué dans la peroxydation lipidique, l'oxydation des protéines (Radi et al. 1991) et la nitration des résidus d'acides aminés aromatiques (Ischiropoulos 1992).

1.3. Les lésions radio-induites des macromolécules biologiques

1.3.1. Les dommages à l'ADN

En dehors de toute exposition à des RI, des lésions de l'ADN se produisent en permanence. Elles sont de différents types, les mêmes qu'après exposition aux RI (Tableau 1).

Type de dommage	Dommages endogènes (températures 37 °C) métabolisme	Dommages radio-induits (rayonnements ionisants) radicaux libres
	Taux de lésions induites par cellule et par jour	Fréquence de lésions par génome (2n) / Gy
Cassures simple-brin	55.000	1.000
Pertes de bases puriques	12.000	
Pertes de bases pyrimidiques	600	
Dommages de bases		2.000
-Déaminations de la cytosine	200	
- Oxydations de bases	> 1.000	
- Méthylations de la guanine	3.000	
Cassures double-brin	8	40
Pontages ADN/ADN	8	30
Pontages ADN/protéine	Quelques uns	150

Tableau 1. Liste des types de dommages endogènes et radio-induits de l'ADN (d'après Tubiana et al ; Ward 1988, Burkart et al.1999).

En revanche, les RI conduisent à une quantité et à une répartition différente des lésions. En effet, l'ADN est considéré comme la cible principale des RI et les dommages produits sont variés (Figure 6) : pontages intra-brin ou ADN/ADN, cassures simple brin, modifications de base, pontages ADN-protéine, formation de sites abasiques, cassures double brins (CDB) (Tableau 1).

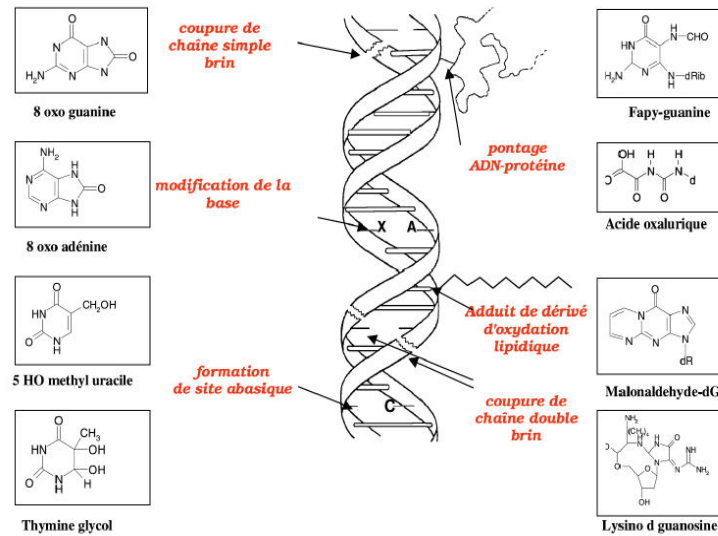


Figure 6. Les types de lésion de la molécule d'ADN induites par les radiations ionisantes. D'après (Cadet 2004).

- Les Cassures Simple-Brin (CSB)

Ce type de cassures est le plus fréquent, 1.000 CSB sont produites suite à l'irradiation par un rayonnement de faible TEL à une dose de 1 Gy dans une cellule de mammifère. Le radical OH^{*} généré par la radiolyse de l'eau va s'attaquer aux sucres de l'ADN. Le désoxyribose perd ainsi un atome d'hydrogène conduisant à la rupture de la liaison entre le phosphate et le sucre. Ces cassures se caractérisent par : un taux d'apparition exponentielle en fonction de la dose de rayonnement, une faible répercussion en terme létalité sur les cellules ainsi qu'une réparation très rapide dans l'heure qui suit l'irradiation.

- Les Cassures Double-Brin (CDB)

Un rayonnement de faible TEL de 1 Gy peut entraîner en moyenne la formation de 40 CDB. Le taux de survenue de ces lésions est donc faible mais, contrairement aux CSB, les CDB sont très délétères pour les cellules et peuvent avoir des conséquences graves tels que la formation d'aberrations chromosomiques, de mutations et d'instabilités chromosomiques (Tubiana et al. 2008). Ce type de lésion est le résultat de la rupture des 2 chaînes d'ADN en des sites proches l'un de l'autre lors de la production du radical hydroxyle suite à la collision entre la particule et la molécule d'ADN. Il peut aussi résulter de CSB mal ou non réparées (Bhargava, Onyango, et Stark 2016). Une CDB est dite homologue si elle se produit au niveau de la même paire de bases, hétérologue dans le cas contraire. Les CDB hétérologues sont les plus fréquentes (Calugaru 2011).

- Les dommages de bases

Les radicaux hydroxyles provenant de la radiolyse de l'eau vont s'attaquer aux sites aromatiques des bases de l'ADN : puriques et pyrimidiques, ce qui aura pour conséquence la formation de bases oxydées (Ward 1988). On peut en dénombrer 2.000 bases par cellule par Gy. La principale et la plus étudiée est la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine (8-oxo-dG) et elle constitue un bon marqueur de ces dommages (Ravanat et Douki 2012). Elles résultent principalement de l'attaque des radicaux hydroxyles sur le cycle aromatique de la 2'-désoxyguanosine (dG) mais sont également produites par ionisation directe. Les bases oxydées extracellulaires peuvent aussi être quantifiées, elles proviennent principalement de l'oxydation du pool de nucléotides dans le cytoplasme (Haghdoost, Sjölander, et al. 2006). Elles sont aussi des biomarqueurs d'intérêt car leur excrétion pourrait participer aux effets bystander et aux vagues secondaires d'ERO produites tardivement après irradiation (Glebova et al. 2015). Les dNTPs modifiés et provenant du pool de nucléotides peuvent être incorporés par la suite dans l'ADN (Skiöld et al. 2013; Haghdoost et al. 2001; Lagadu et al. 2010).

- Les pontages

Ces attaques se produisent entre l'ADN et les protéines que ce soit inter- ou intra-brins suite à la production des ERO. Ces lésions vont causer une distorsion de la molécule d'ADN ce qui aura pour conséquence d'interrompre différents mécanismes biologiques comme la réplication (Cadet et al. 2004).

- Les altérations des sucres

Ce type de lésions est dû à l'attaque de la molécule d'ADN par le radical hydroxyle. Ceci entraîne la libération du sucre, la formation de sites abasiques ou, dans certains cas, la formation de CSB (Evans, Dizdaroglu, et Cooke 2004).

- Les lésions de l'ARN

L'ARN, de par sa localisation cytoplasmique, est plus facilement la cible des rayonnements ionisants. Cependant, sa durée de vie est courte mais ses lésions peuvent engendrer des altérations des protéines. Les lésions radioinduites principales sont des cassures de brin. Elles sont très peu étudiées. De nouvelles méthodes ont été mises en place comme la RT-PCR après l'addition d'une queue poly(A) en 3' (Tie et al. 2011).

1.3.2. Les lésions des lipides

Même si les lésions de l'ADN sont considérées comme jouant un rôle primordial après irradiation, le rôle des lésions des lipides après irradiation est sans doute sous-estimé. Les lipides constituent notamment la membrane cellulaire au travers de 4 familles lipidiques : les phospholipides, les sphingolipides, les glycolipides et les stérols. Les acides gras polyinsaturés (PUFA, Poly Unsaturated Fatty Acids), appartenant aux phospholipides, peuvent subir une peroxydation. Celle-ci est générée par l'action des ERO produites suite à l'irradiation sur les PUFA tels que les acides linoléiques, arachidoniques et docosahexaénoïques présents dans la membrane. Cette réaction se déroule en 3 étapes principales : initiation, propagation et terminaison (Figure 7A). Cette réaction est initiée par la production d'espèces radicalaires au

travers la réaction de Fenton, ces radicaux vont ensuite réagir avec des substrats et vont donner lieu à la production d'autres composés radicalaires. Enfin, ces derniers vont être soit dégradés soit vont réagir avec d'autres radicaux. Ainsi, sont générés 3 composés contenant des groupements carbonyles : le malondialdéhyde (MDA), l'acroléine et le 4-hydroxy-

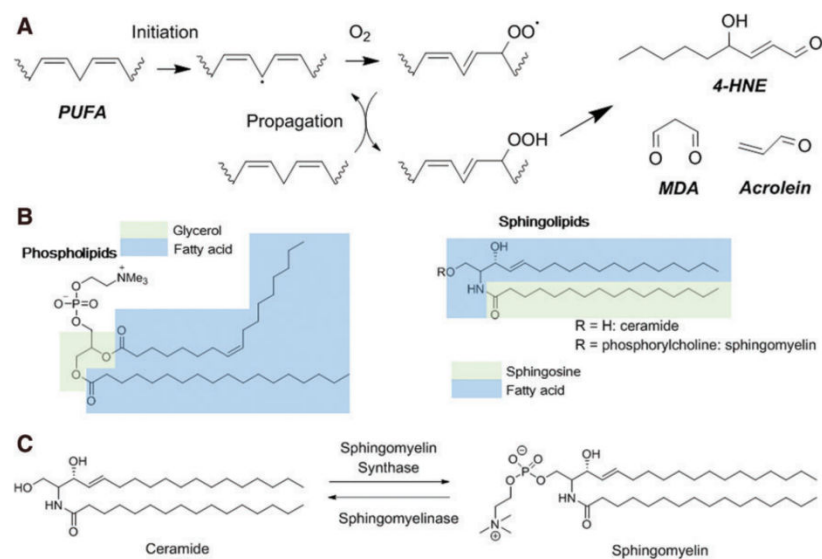


Figure 7. Lésions radio-induites des lipides. (A) Peroxydation des lipides. 4-HNE : 4-hydroxy-2-nonenal ; MDA : malondialdéhyde. (B) Altération des sphingolipides. (C) Formation de céramide. D'après (Pouget, Georgakilas, et Ravanat 2018).

2-nonenal (4-HNE). Par ailleurs, ces composés peuvent former des adduits à l'ADN participant à la toxicité des RI. Et le 4-HNE peut se lier aux protéines modifiant ainsi leur fonction (Doorn et Petersen 2003). Après exposition aux RI, le métabolisme des sphingolipides, constituants majeurs de la membrane cellulaire, est également altéré (Figure 7B). De même, une production rapide de céramide a lieu à partir de la sphingomyéline après irradiation (Figure 7C). Les céramides sont des seconds messagers importants ayant un rôle non seulement membranaire mais aussi cellulaire via les voies de signalisation (Corre, Niaudet, et Paris 2010). Les lésions des lipides vont avoir plusieurs impacts sur la cellule à savoir : l'altération de la membrane lipidique, du gradient d'ions et de la fluidité membranaire (Mishra 2004). Elles seront

également impliquées dans l'apparition de certaines physiopathologies comme les phénomènes inflammatoires, les cancers, et dans certaines maladies neurodégénératives et rénales ainsi que, dans certains cas, dans le déclenchement de la ferroptose (Gaschler et Stockwell 2017; Cadet et al. 2004; Pouget, Georgakilas, et Ravanat 2018).

1.3.3. L'oxydation des protéines

Les RI affectent également directement les protéines (Zhou et al. 2009) conduisant à des modifications de l'expression ou de l'activité de celles-ci. Les voies principalement impliquées sont des modifications post-transcriptionnelles (Tapio 2013), l'oxydation des acides aminés (Stadtman 1993) et la carbonylation des protéines (Chondrogianni et al. 2014). Tous les acides aminés peuvent être oxydés. Ceux qui possèdent des groupements thiols (méthionine, cystéine) seraient les plus sensibles (Chondrogianni et al. 2014).

La carbonylation est considérée comme la lésion des protéines la plus délétère (Barford 2004). Il existe 4 voies de carbonylation des protéines : l'oxydation catalysée par les métaux, l'oxydation du tryptophane, ainsi que via les produits finaux de glycation avancée et les produits de la peroxydation lipidique (Figure 8). La carbonylation des protéines augmente avec le vieillissement et après des stress tels que l'irradiation et est aussi impliquée dans certaines maladies dégénératives (Dalle-Donne et al. 2003).

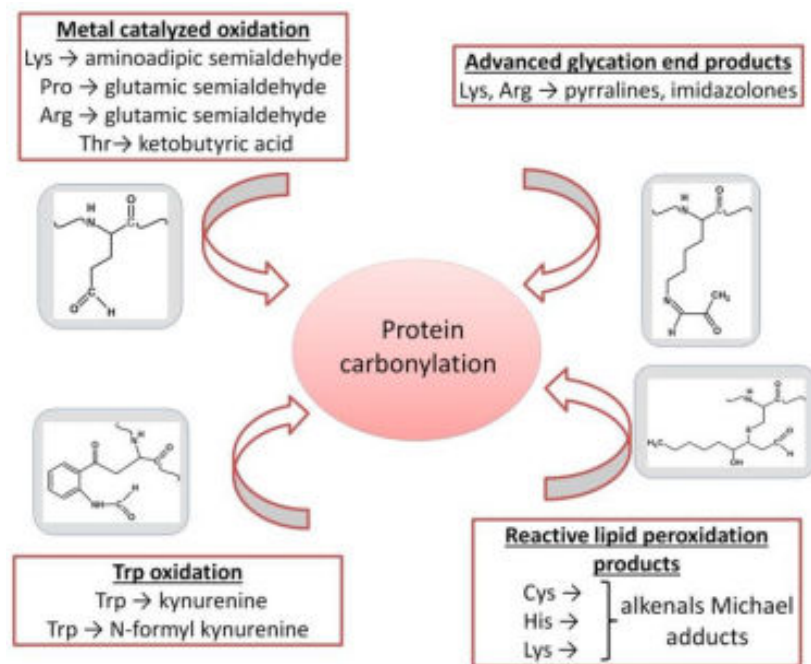


Figure 8. Mécanismes de carbonylation des protéines. D'après (Fedorova et al. 2014).

1.4. Les réponses cellulaires aux rayonnements ionisants

Pour répondre au stress induit par l'exposition à des RI, les cellules ont mis en place différents systèmes de défenses antioxydantes, de régulation du cycle cellulaire et de réparation des

macromolécules biologiques. Si ceux-ci sont dépassés, différents mécanismes de mort cellulaire existent afin d'éliminer les cellules endommagées par les RI.

1.4.1. Les systèmes de défenses antioxydantes

Un stress oxydatif découle d'un déséquilibre entre les pro- et les anti-oxydants, en faveur des oxydants, conduisant à une perturbation de la signalisation cellulaire, du contrôle redox et/ou de dommages moléculaires multiples (Sies 2015). En effet, les ERO produites à l'issue de l'irradiation vont entraîner différentes réponses cellulaires (Christophe Hennequin, Quero, et Favaudon 2011). Il existe 2 types de systèmes de défense antioxydante qui fonctionnent à différents niveaux de la cascade d'activation de l'oxygène.

- Les défenses non-enzymatiques

Elles sont représentées par une série de petites molécules antioxydantes qui peuvent piéger rapidement et inactiver les espèces réactives de l'oxygène. On trouve : la vitamine A (β -carotène), la vitamine E (α -tocophérol), la vitamine C (ascorbate), l'ubiquinone et le glutathion. Ces molécules sont

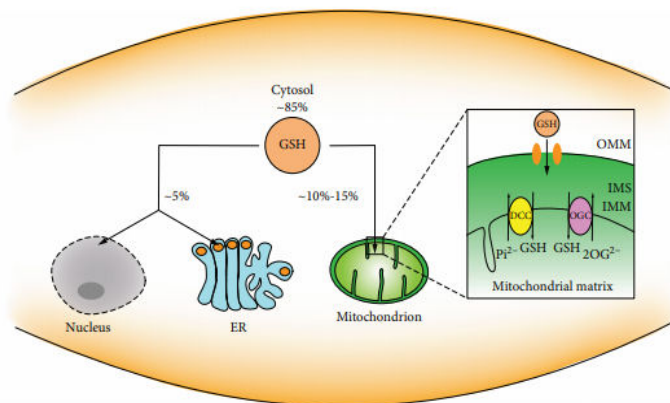


Figure 9. La distribution du glutathion au sein d'une cellule.
D'après (Lv et al. 2019).

responsables de l'homéostasie réductrice du fait de leur position en première ligne de la réponse à la production d'ERO (Mirończuk-Chodakowska, Witkowska, et Zujko 2018). La vitamine E est liposoluble et existe sous 8 différentes formes. Elle provient des aliments car elle n'est pas synthétisée par l'homme. En plus de son rôle protecteur contre l'inhibition des espèces radicalaires et l'activation des endonucléases, elle possède plusieurs rôles bénéfiques : allergies, cancer, système cardiovasculaire, hypertension ou encore inflammation (Miyazawa et al. 2019; Valko et al. 2006). La vitamine C participe à plusieurs processus physiologiques chez l'être humain. Cette molécule hydrosoluble n'est pas synthétisée par l'homme. Elle possède un pouvoir antioxydant qui lui permet d'éliminer les espèces radicalaires d'une part mais également les espèces réactives de l'azote (RNS, Reactive Nitrogen Species). Elle joue également un rôle de « co-enzyme » dans de nombreuses réactions enzymatiques et participe également à la régénération de certaines molécules comme l' α -tocophérol, le GSH et β -carotène (Kojima 2004; Carr et Frei 1999). La vitamine A comme la vitamine E est liposoluble et n'est pas

synthétisée par l'homme. Elle est essentielle pour le fonctionnement physiologique. Son principal rôle est d'empêcher la peroxydation des lipides (Milisav, Ribarič, et Poljsak 2018; Chiu, Fischman, et Hammerling 2008). L'ubiquinone est reconnue comme un puissant anti-oxydant, cette molécule est présente en grande quantité dans le cœur, le cerveau, le foie et les reins. Cette molécule est impliquée dans l'inactivation des lipides peroxydés et la diminution des radicaux de l' α -tocophérol (Yamashita et Yamamoto 1997; Rodríguez-Carrizalez et al. 2016). Le glutathion est un tripeptide constitué de 3 acides aminés : glycine, cystéine et glutamate. Il est présent dans les conditions normales dans les cellules principalement soit sous sa forme réduite (GSH) ou sa forme oxydée (GSSG). Sa distribution dans les compartiments cellulaires est principalement dans le cytoplasme à une forte concentration mais est également présent dans la mitochondrie, le noyau et en de très faibles quantités dans le réticulum endoplasmique (Figure 9). Le glutathion joue plusieurs rôles dans la cellule dont les principaux sont : (1) le maintien du statut rédox de la cellule, (2) la détoxification des produits d'oxydation et des xénobiotiques et (3) le rôle de coenzyme pour la glutathion peroxydase ou la glutathion déshydrogénase (Reinbold, Koehler, et Rychlik 2014; Lu 2013).

- Les défenses enzymatiques

Elles agissent en cascade (Figure 10). La superoxyde dismutase (SOD) constitue la première ligne de défense. Cette enzyme catalyse la dismutation de l'anion superoxyde selon la réaction (1) donnant lieu à la formation du peroxyde d'hydrogène et de l'oxygène.



La SOD existe sous 3 formes selon qu'elle contient du fer, du cuivre et du zinc ou du manganèse dans son site actif. On trouve : la cytosolique Cu/Zn-SOD (32 kDa), la mitochondriale Zn-SOD (96 kDa) et l'extracellulaire EC-SOD (Valko et al. 2006; Kinnula et Crapo 2003).

La catalase dont la localisation est dans le peroxysome a comme fonction principale décrite depuis longtemps, la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène selon la réaction :

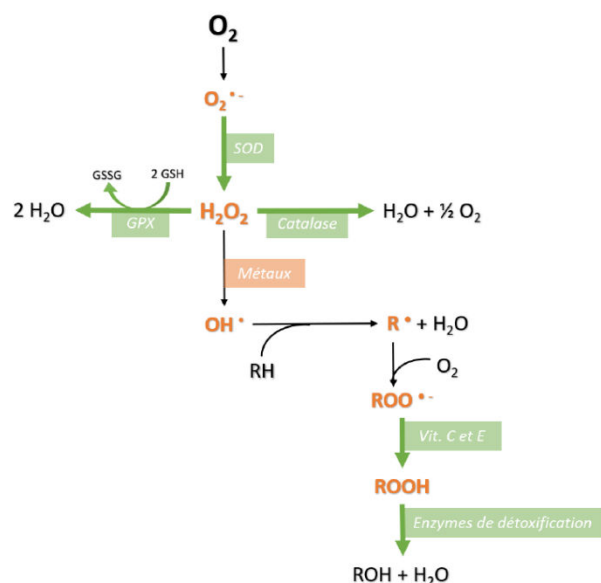
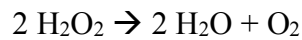
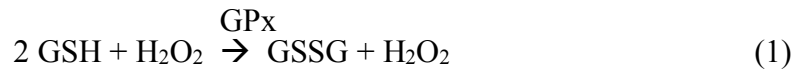


Figure 10. Cascade de l'oxygène et systèmes de défenses des ERO.



La catalase a un fort potentiel détoxifiant, son rôle est de préserver l'organisme de l'accumulation de peroxydes d'hydrogènes qui peut causer des dommages graves aux cellules (Valko et al. 2006).

De la levure à l'homme, la glutathion peroxydase (GPx) à expression constitutive contribue à réduire les hydroperoxydes (R-OOH) tels que le H_2O_2 (1) ou les peroxydes lipidiques (2), selon la réaction suivante :



Le glutathion, intervenant essentiel du maintien du potentiel redox dans le cytoplasme, joue ici un rôle central puisqu'il sert de donneur d'électron à la GPx, permettant ainsi la réduction des hydroperoxydes en alcools. Le pool de glutathion réduit (GSH) est renouvelé par une autre enzyme importante dans la régulation du stress oxydant, la glutathion réductase (GR), qui, comme son nom l'indique, réduit le glutathion oxydé (GSSG) via l'oxydation simultanée du NADPH/H^+ en NADP^+ (3).



D'un point de vue structural, la GPx est une enzyme homotétramérique. Chez les mammifères, la forme la plus prépondérante est la GPx1. Il s'agit d'une sélénoprotéine qui contient, au cœur de son site actif, un résidu particulier : une sélénocystéine (Valko et al. 2006; Jardim et al. 2013).

Le peroxyde d'hydrogène peut donc être détoxifié par la catalase ou la GPx, mais il peut être aussi transformé en radical hydroxyle par la réaction d'Haber-Weiss (Figure 5).

1.4.2. La régulation du cycle cellulaire

L'intégrité et la bonne configuration du génome est essentielle pour la survie des cellules et le maintien de l'homéostasie cellulaire. Les RI altèrent la progression dans le cycle cellulaire, les cellules sont plus radiosensibles en phases G2 et M et plus radorésistantes en phase S (C. Hennequin, Quero, et Favaudon 2008). Des études ont montré un arrêt en phase G1 (Tubiana et al. 2008) et S du cycle suite à l'exposition de certaines lignées cellulaires aux RI. Ces arrêts permettent à la cellule de réparer les lésions radio-induites en activant les voies de signalisation qui entrent en jeu dans la réparation de l'ADN endommagé afin d'empêcher la cellule de progresser dans le cycle avec des aberrations chromosomiques qui aura pour conséquence la formation de mutations et dans certains cas la mort cellulaire. Chaque phase du cycle cellulaire possède alors des molécules qui contrôlent le cycle cellulaire lors de la réplication appelées « Checkpoint ». Ces molécules vont être activées suite à la détection des dommages et vont fonctionner sous forme de plusieurs « réseaux » impliquant plusieurs cascades de signalisation (Tubiana et al. 2008; Ashwell et Zabludoff 2008) (Figure 11).

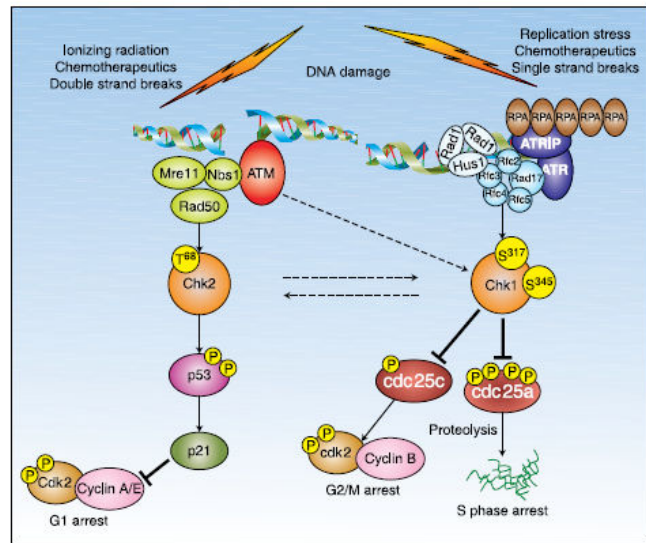


Figure 11. Les checkpoints intervenant dans le cycle cellulaire. D'après (Ashwell et al. 2008).

- La signalisation des cassures de l'ADN

Les différentes lésions de l'ADN vont entraîner l'activation de différents mécanismes de réparation appelés « DNA damage response » (DDR) que la cellule possède en mettant en jeu des molécules qui vont jouer un rôle dans la détection, la réparation et la signalisation de ces lésions en réponse à l'irradiation (Figure 12). Les lésions non réparées peuvent conduire à l'apparition de toxicité à court et à long terme (Christophe Hennequin, Quero, et Favaudon 2011; Laurent 2018).

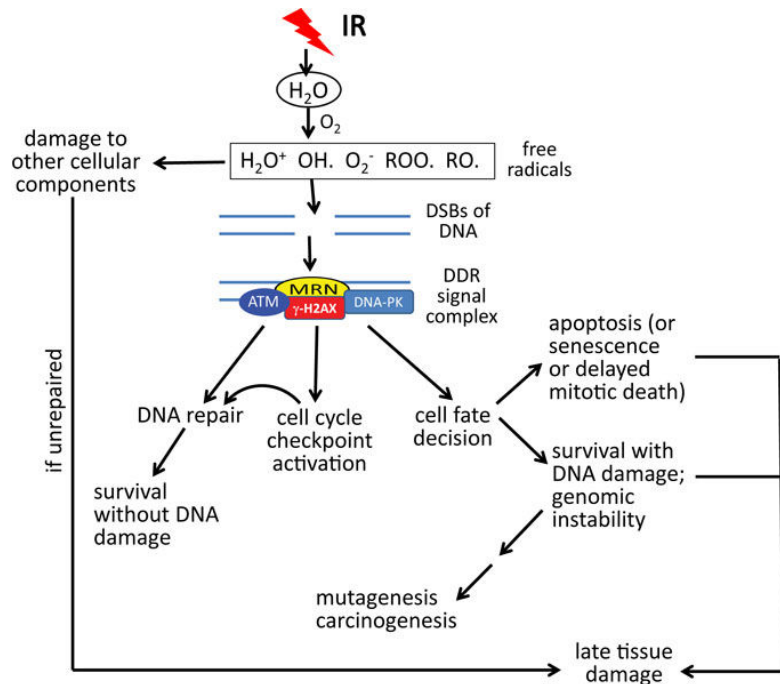


Figure 12. Réponses aux CDB de l'ADN (DDR) en lien avec les syndromes radio-induits aigus et tardifs. D'après (Rosen et al. 2015).

ATM est une sérine-thréonine-kinase qui est activée par les CDB (Figure 11). Cette protéine joue un rôle clé de senseur des CDB qui sont produites lors d'une forte irradiation (Christophe Hennequin, Quero, et Favaudon 2011). Ces CDB vont être détectées soit par le complexe Ku86/Ku70/DNAPK ou le complexe MRE11/RAD50/NBSI. Ce dernier va permettre le recrutement et la phosphorylation du complexe ATM/ATR qui va, à son tour, phosphoryler les histones H2AX présentes dans les noyaux. Ces histones phosphorylées vont permettre l'activation des protéines effectrices qui vont jouer un rôle soit dans (i) le contrôle du cycle cellulaire (Chk1 ou Chk2) (ii) dans l'induction de l'apoptose (p53, Bcl2, Bax) ou (iii) dans la réparation (RAD51, BRCA1, DNA-PKcs). Une étude réalisée par Poletto *et al.* (Poletto et al. 2017) sur des cellules qui ont été déplétées en ATM a démontré une forte accumulation des ERO et la mise en place d'une nouvelle organisation cellulaire afin de contrecarrer les dommages engendrés par le stress oxydatif (Fletcher et al. 2018; Nguyen et al. 2016; Poletto et al. 2017).

Tout comme ATM, DNA-PKc est une sérine-thréonine-kinase composée d'une sous-unité catalytique, la DNA-PKc, ainsi qu'une sous unité hétérodimère Ku70/Ku80. Cette dernière permet le recrutement de DNA-PKc suite à la présence de CDB. La DNA-PKc intervient dans la voie NHEJ de réparation de l'ADN et par son activité kinase participe à la phosphorylation

de plusieurs protéines dont p53 (Mohiuddin et Kang 2019; Callén et al. 2009; Menolfi et Zha 2020).

TP53 est un gène suppresseur de tumeur qui est impliqué dans plusieurs processus physiologiques et joue un rôle clé en réponse aux RI dans la régulation du cycle cellulaire, la mort cellulaire par apoptose et dans l'arrêt du cycle cellulaire lors de la phase G1. En réponse aux dommages de l'ADN, p53 est phosphorylé par ATM et DNA-PK. Cette phosphorylation a pour conséquence une diminution de son interaction avec la protéine MDM2. MDM2 est une ubiquitine ligase qui a pour rôle son ubiquitination et ainsi sa dégradation par le protéasome. p53 devient stable et s'accumule dans la cellule et va pouvoir activer les gènes de régulation des points de contrôle du cycle cellulaire. Cette ubiquitination a un rôle dans la dégradation de p53 mais également contribue à son passage vers le cytoplasme où son rôle de facteur de transcription ne sera plus effectif (Tubiana et al. 2008; Le et al. 2017; Soussi 1998, 2; Me 2004). Les poly(ADP ribose)polymérasés (PARP) agissent dans le cas des CSB. Ils sont constitués de 17 enzymes possédant chacune un site catalytique différent. Parmi eux, les deux enzymes PARP-1 et PARP-2 possèdent un site catalytique qui est directement activé par les CSB et sont donc considérées comme les plus impliquées dans la détection et dans la réponse aux dommages de l'ADN (Tartier et al. 2003; Godon et al. 2008). Leur rôle consiste en une modification post-traductionnelle, la PARylation des histones, conduisant à une polymérisation d'unités d'ADP ribose sur des protéines cibles, et qui est provoquée par les CSB de l'ADN. Les PAR recrutent ensuite des protéines additionnelles telles que p53 et XRCC-1 impliquées dans la réparation par excision de base (BER) (Ko et Ren 2012). En plus de leur rôle dans la réparation de l'ADN, les PARP possèdent également d'autres rôles dans la réplication, la transcription, le remodelage de la chromatine ainsi que la mort cellulaire (Pion et al. 2005; Godon et al. 2008; Ko et Ren 2012)

- Les arrêts du cycle cellulaire (phase G1/S/G2)

L'arrêt en G1 intervient juste avant l'entrée dans la phase S. L'arrêt du cycle en cette phase est dû à l'accumulation de p53 phosphorylé par le biais de Chk2 suite à l'activation d'ATM en réponse aux dommages de l'ADN (Figure 11).

L'arrêt en G2-M intervient juste avant la mitose, phase très importante du cycle cellulaire. Les dommages de l'ADN vont activer le complexe ATM/ATR qui va activer la phosphorylation des molécules Chk1 et Chk2. Ces dernières vont à leur tour phosphoryler la phosphatase Cdc25A, cette phosphorylation va lui permettre sa translocation dans le cytoplasme et l'inhibition du complexe Cdc2/cycline B (Figure 11). Une étude réalisée par Nagasawa *et al.*

sur plusieurs lignées cellulaires a montré l'exposition de ces cellules à la même dose de rayonnement induit un arrêt du cycle en G2 (Nagasawa et al. 1994).

1.4.3. Les mécanismes de réparation des macromolécules biologiques

- La réparation de l'ADN

Les cellules possèdent des mécanismes de réparation qui vont potentiellement permettre la restauration des lésions de l'ADN. Il existe plusieurs systèmes intervenant en fonction du type et de la localisation de la lésion. Ces systèmes fonctionnent en réseau en mettant en jeu une cascade de signalisation impliquant différentes molécules. L'absence et/ou la défaillance de l'une de ces molécules entraîne une défectuosité dans le système de réparation ce qui aura pour effet une perte de fonction pouvant aboutir à des conséquences comme la formation de mutations, la mort cellulaire, et l'apparition de certaines pathologies comme le cancer (Jackson et Bartek 2009). En fonction du type de réparation, les lésions sont soit toutes restaurées et la réparation est donc dite « fidèle » ou, dans certains cas, il y a une perte d'information et la réparation est dite « infidèle » (C. Hennequin, Quero, et Favaudon 2008). Après irradiation, on dénombre 3 mécanismes majeurs : la réparation par excision de base, la réparation par excision de nucléotide ou la réparation par recombinaison homologue ou non (Figure 13).

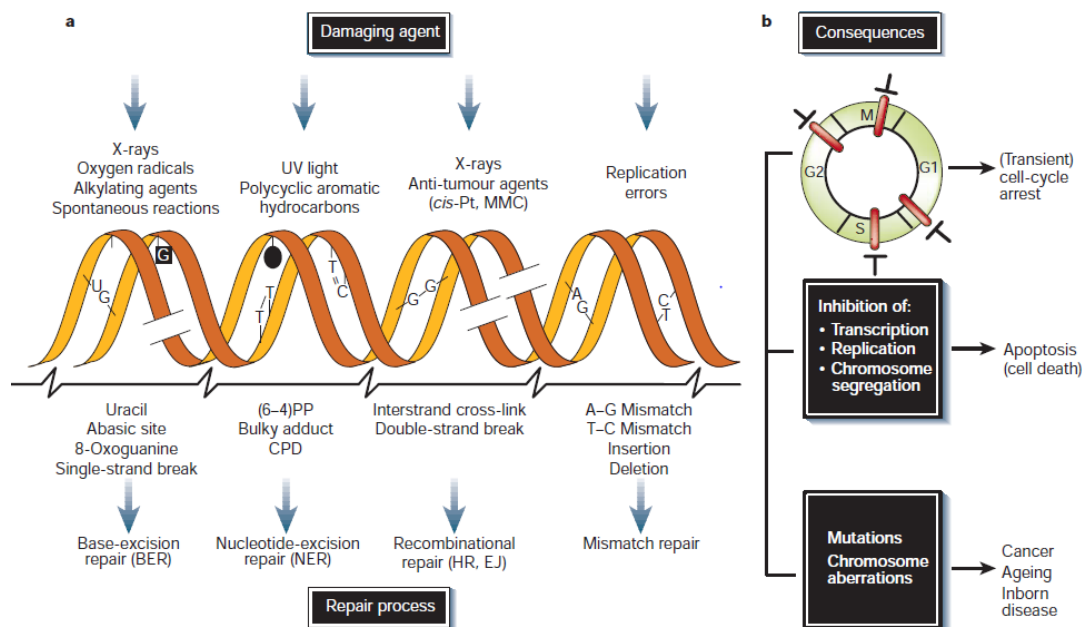


Figure 13. Représentation (a) des voies de réparation de l'ADN en fonction du type et de la nature de la lésion ainsi que (b) de leurs conséquences. D'après (Hoeijmakers 2001).

Il existe également un autre système de réparation : la réparation des bases mésappariées qui permet la restauration de la stabilité génomique et intervient principalement pour réparer les erreurs qui sont survenues lors de la réplication par l'ADN polymérase (Hong et al. 2008).

Après irradiation, la réparation par excision de base (BER, Base Excision Repair) prend en charge principalement les CSB et certaines altérations de bases soit par alkylation ou déamination et les sites abasiques qui sont générés soit de manière spontanée dans la cellule soit sont des résultantes des phénomènes oxydatifs induits par les RI. Nous pouvons distinguer deux voies de réparation possible en fonction du type de lésion : la 1^{ère} appelée « short-patch pathway » concerne les bases endommagées et la 2^{ème} appelée « long-patch pathway » concerne les CSB (Kelley, Logsdon, et Fishel 2014). La première « short-patch pathway » est initiée par la détection d'une base endommagée par une glycosylase ensuite un complexe constitué d'une AP ligase/endonucléase/ ADN polymérase β est formé, la brèche est alors reconnue et remplie. Enfin le complexe constitué d'une XRCC1/Ligase III est recruté pour la restauration de l'ADN (Robertson et al. 2009). Concernant la 2^{ème} voie « long-patch pathway » celle-ci prend en charge les CSB qui sont reconnues par les PARP et la protéine XRCC1. Cette voie est contrôlée par l'antigène de prolifération cellulaire PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen). Ce dernier permet le remplissage de la brèche et la formation composé de dntp/polymér δ/ϵ /FEN1 (flap structure-specific-endonuclease1) / et de la ligase III pour la reconstitution de l'ADN (Godon et al. 2008).

La réparation par excision de nucléotide (NER, Nucleotide Excision Repair) prend en charge les adduits à l'ADN et les ponts intra-brins pouvant provoquer des distorsions de la molécule d'ADN. Lors de ce processus de réparation, la reconnaissance des lésions est effectuée par le complexe XPC-RAD23B. Ce complexe recrute ensuite le facteur TFIIH composé de 2 sous-unités hélicases XPB et XPD ainsi que XPA-RPA. L'excision de la lésion se produit en présence d'une endonucléase ERCC1/XPF. La polymérase δ/ϵ s'associe aux facteurs de réplifications PCNA/RFC et XPA, ce complexe permet la synthèse d'un nouveau brin afin de combler la brèche. Enfin l'intervention d'une ADN ligase I permet la restauration de l'ADN (Schärer 2013).

La réparation des CDB est effectuée par la recombinaison homologue (HR, homologous recombination) ou par la jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ, Non-Homologous End Joining). La NHEJ a un rôle principal dans la réparation des CDB lors de la phase G1 du cycle cellulaire (C. Hennequin, Quero, et Favaudon 2008). Les CDB sont reconnues par l'hétérodimère Ku70/Ku80, ce dernier va interagir avec la DNA-PKcs, l'ADN ainsi se stabilise.

Enfin, le recrutement de XRCC4 assure la stabilité de l'ADN ligase IV et permet la ligation et la reconstitution de l'ADN (Figure 14, droite) (Scully et al. 2019). La recombinaison homologue repose sur l'utilisation de l'homologue du chromosome sur lequel la CDB a eu lieu lors des phases S et G2 du cycle cellulaire (C. Hennequin, Quero, et Favaudon 2008). Suite à la détection des CDB par la protéine ATM, ces CDB vont être reconnues par le complexe MRE/RAD50/NBS1 ce qui aura pour conséquence la libération de l'extrémité 3'. Les protéines RAD52 et RPA (Replication Protein A) se positionnent sur l'extrémité 3' du brin opposé pour les protéger des exonucléases. Ensuite, la protéine Rad51 est recrutée. Cette dernière a pour rôle la recherche d'homologie dans la chromatide sœur sous le contrôle de BRCA1 et BRCA2 (Sancar et al. 2004; Scully et al. 2019). L'ADN polymérase intervient pour la synthèse de l'ADN et l'ADN ligase participe à sa ligation. Ce mécanisme est hautement fidèle (C. Hennequin, Quero, et Favaudon 2008) (Figure 14, gauche).

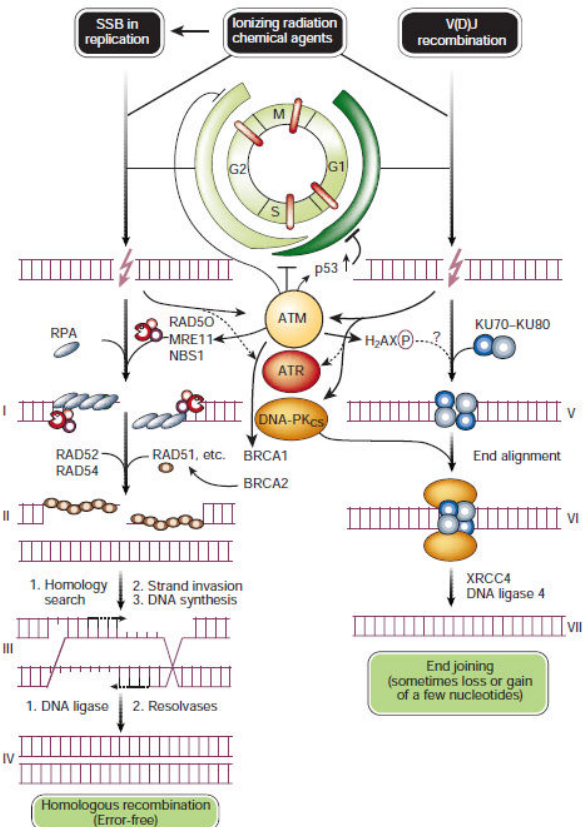


Figure 14. Réparation par recombinaison homologue (gauche) et non-homologue (droite). D'après (Hoeijmakers 2001).

- La réparation des lipides

Les phospholipases A2 et C ainsi que la GPx permettent la réparation des lipides oxydés (Figure 15).

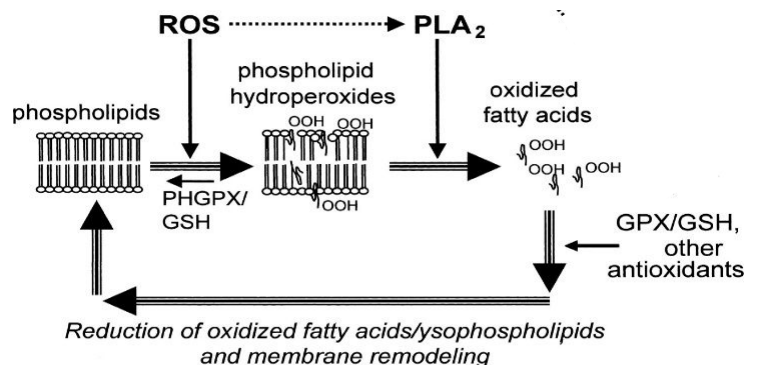


Figure 15. Réparation des lipides oxydés. D'après (Swift, McHowat, et Sarvazyan 2003).

- La réparation des dommages aux protéines

Les protéines oxydées qui ont subi des dommages réversibles peuvent être réparées par des réductases (Figure 16). Lorsque les dommages aux protéines sont irréversibles, les protéines sont dégradées par le protéasome

(Chondrogianni et al. 2014). Les acides aminés libérés pourront servir à une nouvelle synthèse de protéines. Après irradiation, la quantité de protéines oxydées augmente entraînant une agrégation de ces protéines

endommagées et une saturation des systèmes de protéolyse et donc une diminution de l'efficacité du protéasome (Grune et al. 2004) (Figure 16).

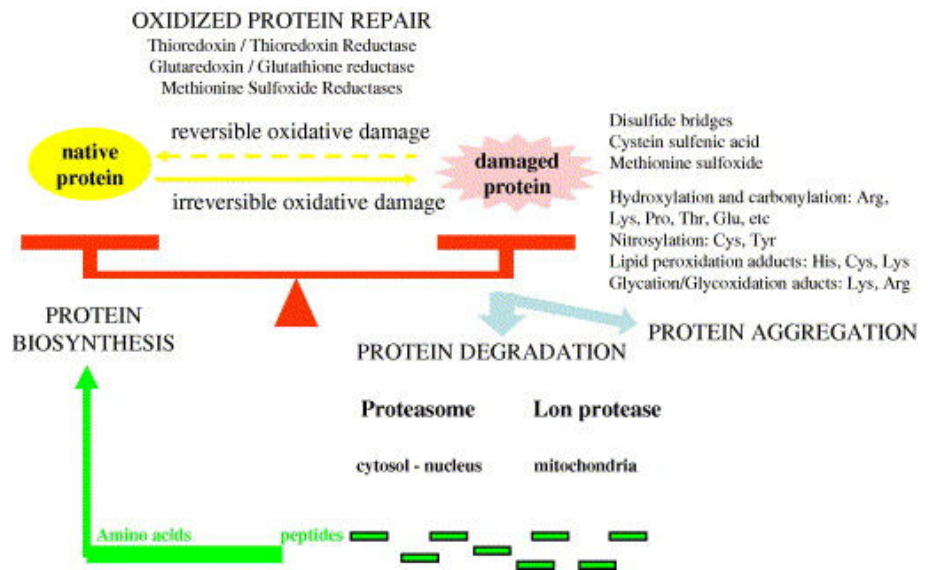


Figure 16. Réparation des protéines oxydées. D'après (Friguet 2006).

1.4.4. La mort cellulaire induite par les rayonnements ionisants

La cellule met en place des mécanismes de réparation afin de contrecarrer les lésions radioinduites. Lorsque ces mécanismes ne sont pas en mesure de restaurer l'équilibre de base, les mécanismes de mort cellulaire sont alors mis en place afin d'éliminer les cellules endommagées (Figure 17). Ces mécanismes sont divers après irradiation : programmés ou non et interviennent différemment selon les types cellulaires mis en jeu dans les tissus traversés par les rayonnements (Tableau 2).

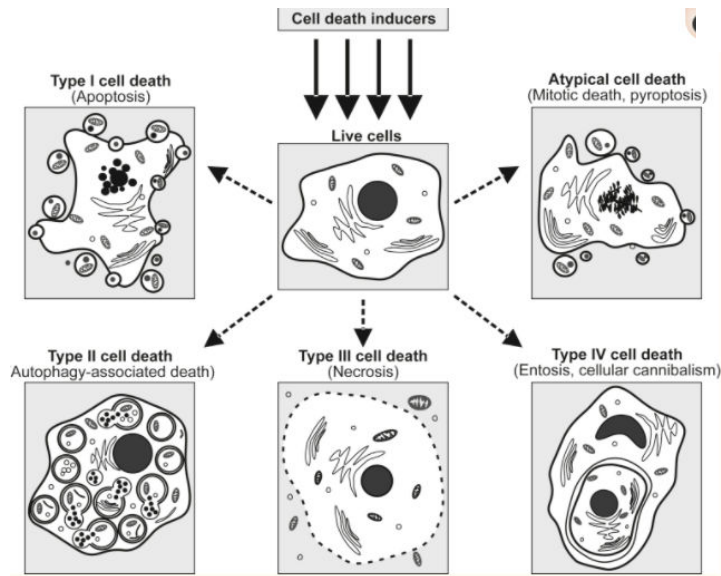


Figure 17. Les différents types de morts cellulaires. D'après (Martins et al. 2017).

Mort immédiate	Sénescence	Mort mitotique nécrose	Apoptose	Autophagie
Non programmée	Programmée	Non programmée	Programmée	Programmée
Cellules épithéliales Cellules endothéliales Myocytes Fibroblastes	Fibroblastes	Cellules épithéliales Mutations/ délétions p53	Lymphocytes Thymocytes Prostate Acini salivaires Cryptes intestinales Cellules endothéliales	Neurones Cellules épithéliales

Tableau 2. Les morts cellulaires radio-induites selon le type cellulaire. D'après (Tubiana et al. 2008).

- La sénescence

L'arrêt en G1 concerne les cellules qui ont été dans l'incapacité de réparer les lésions de l'ADN générées par l'irradiation, le stress oxydant ou tout autre facteur interne ou externe. Cette phase du cycle cellulaire a un rôle très important dans la suppression de tumeurs et dans la réponse aux thérapies dans le cadre du traitement du cancer. Le processus de sénescence induit par un stress (SIPS, Stress-Induced Premature Senescence) concerne principalement les fibroblastes (Tableau 2) et met en jeu plusieurs effecteurs (p21^{Waf1}, p16^{INK4A}, p53) qui engendrent l'arrêt du cycle cellulaire et l'entrée en sénescence prématurée.

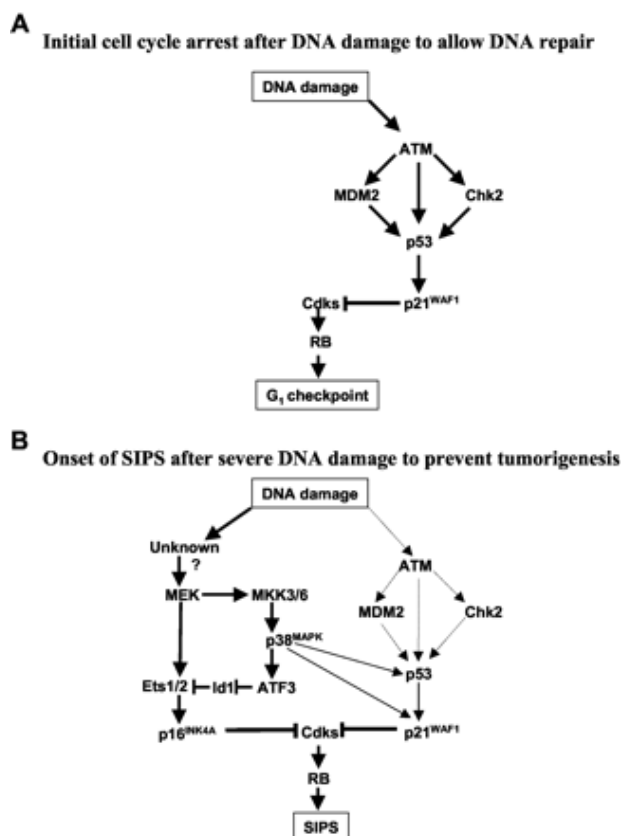


Figure 18. Schéma des voies conduisant des dommages de l'ADN à l'arrêt en G1 (A) ou à la sénescence (B). SIPS : Stress Induced Premature Senescence. D'après (Naka et al., 2004).

- La mort mitotique

La catastrophe mitotique ou mort différée a lieu dans les cellules épithéliales (Tableau 2) lorsque la cellule est incapable d'achever une mitose ou de se répliquer ou encore lors d'une mutation ou d'une déplétion de p53 dans les cellules tumorales. Ce processus est induit par l'irradiation et par des traitements conduisant à l'accumulation de mutations chromosomiques ou à une déficience dans l'une des molécules de l'avancement de la phase G2. Ce type de mort est caractérisé par la formation de grandes cellules multi- ou binucléées ainsi que la formation de micronoyaux (Vakifahmetoglu, Olsson, et Zhivotovsky 2008; Tubiana et al. 2008) (Figure 17). Les étapes finales des morts différées passent par la sénescence, l'apoptose ou la nécrose.

- L'apoptose

L'apoptose est une mort cellulaire programmée qui a lieu de manière très importante dans les lymphocytes, les thymocytes, la prostate, l'acini salivaires, les cryptes intestinales et les cellules endothéliales (Tableau 2) et avec un taux plus faible (10%) dans les cellules épithéliales. Ce type de mort intervient en réponse à l'irradiation, le stress oxydant mais également suite à la

présence de CDB non réparées. En effet, ces cassures vont induire l'activation de la protéine p53 par le biais d'ATM, un déséquilibre entre les facteurs pro- (Bax) et anti-apoptotiques (Bcl2 et Bcl-X_L) se produit. En conséquence, les mitochondries se dégradent et leurs membranes deviennent perméables ce qui entraîne la libération du cytochrome C dans le cytoplasme et ainsi la formation de l'apoptosome grâce à la protéine Apaf1, et des pro-caspases 9.

- La nécrose

La nécrose est le type de mort cellulaire « non régulé ». Elle a lieu en général dans des conditions physiopathologiques extrêmes tels que la variation du pH, la perte d'énergie ou lors d'un déséquilibre ionique dans la cellule et son microenvironnement suite à l'irradiation mais peut également apparaître dans certaines situations comme l'ischémie, l'inflammation ou lors des infections (Sia et al. 2020). Elle se caractérise notamment par l'activation des lysosomes la lyse rapide des membranes et organites cellulaires (Figure 17).

- L'autophagie

Il s'agit d'un processus de mort cellulaire qui a lieu en réponse à un stress oxydant chronique. Dans la littérature, trois formes d'autophagie ont pu être identifiées : 1) l'autophagie par les protéines chaperonnes, 2) la micro-autophagie et 3) la macro-autophagie. L'autophagie a un rôle important dans la survie, la différenciation, le développement et le maintien de l'homéostasie cellulaire. En effet, elle est impliquée dans l'élimination des organites endommagés et non fonctionnels par la voie de dégradation lysosomale. Cette voie est régulée par le complexe protéique rapamycine 1 (mTORC1) ainsi que plusieurs autres protéines qui participent à l'involution des corps de Golgi, des polyribosomes, du réticulum endoplasmique et des mitochondries (Levine et Kroemer 2008; Janku et al. 2011) (Figure 17).

- L'entose

Ce type de mort cellulaire concerne les cellules tumorales. L'entose est un processus non-apoptotique qui survient dans les tumeurs lorsqu'une cellule est engloutie par une autre cellule non phagocytaire. Ceci est dû à la perte de liaison avec la matrice. La cellule internalisée va donc être soit dégradée par les lysosomes de la cellule hôte, soit se diviser, soit finir par s'échapper. Ce phénomène s'appelle « le cannibalisme cellulaire » (Mailleux, Krajcovic, et Overholtzer 2011; Overholtzer et al. 2007) (Figure 17).

2. La radiothérapie conventionnelle et la protonthérapie

Dans un grand nombre de cancers, la radiothérapie (RT) par photons et/ou électrons, associée ou non à la chirurgie permet de contrôler définitivement la tumeur primitive (Baskar et al. 2012; Chaouni et al. 2020). La probabilité de ce contrôle dépend à la fois des caractéristiques de la tumeur et de son environnement – volume tumoral, radiosensibilité, hypoxie, voies de dissémination – et des modalités de traitement – choix du plan de traitement et contrôle de celui-ci (Barker et al. 2015 ; Brown 2000). Des améliorations des protocoles de RT conventionnelle permettent une diminution des récurrences et des effets secondaires. L'escalade de dose délivrée dans les tumeurs conduit généralement à une augmentation du taux de contrôle local mais aussi du risque de complications dans les tissus sains adjacents. Aujourd'hui, la RT tridimensionnelle permet d'optimiser le volume cible en protégeant les organes et tissus sains situés à proximité en utilisant des collimateurs conformationnels appropriés. La modulation d'intensité des rayonnements assure une conformation en profondeur du volume cible de même qu'une diminution de la dose aux tissus sains (Emami et al. 1991). Dans tous les cas, le principe repose sur la capacité des rayonnements ionisants à induire des lésions toxiques aux tissus tumoraux et à les éviter au maximum sur les tissus sains. Les paramètres décrits ci-dessous vont conditionner l'efficacité & la tolérance de la RT.

2.1. Les grands principes de la radiothérapie

2.1.1. La radiosensibilité intrinsèque

La radiosensibilité des cellules correspond à leur capacité à réparer ou non les lésions induites par les RI (C. Hennequin, Quero, et Favaudon 2008). La loi de Bergonié – Tribondeau publiée en 1906 stipule l'existence d'un lien entre la radiosensibilité et la prolifération cellulaire (Bergonié et Tribondeau 2003). En effet, cette étude a montré que l'irradiation des cellules tumorales épithéliales aux rayons X a plus d'efficacité sur les cellules qui possèdent une activité reproductive élevée qui ont donc un potentiel de prolifération élevé, une capacité de division rapide et ont une forme et une fonction fixée (Bergonié et Tribondeau 2003; Vogin et Foray 2013). En RT, on considère que les capacités de réparation de l'ADN sont plus importantes dans les cellules normales que dans les cellules tumorales et sont à la base de l'effet différentiel observée après irradiation. La radiosensibilité intrinsèque dépend de multiples facteurs tels que les facteurs génétiques et épigénétiques ainsi que la variabilité inter-individuelle (Turesson et

al. 1996). Les syndromes radiosensibles majeurs qui sont connus de nos jours sont : Ataxia-telangiectasia (ATM), Syndrome de Nimègue (NBS), Syndrome de Cockayne (CS), Xeroderma Pigmentosum (XP), Anémie de Fanconi (FANC), Syndrome de Bloom, Hypogammaglobulinémie (LIG1), syndrome ligase IV (Lig4). La plupart du temps, la radiosensibilité intrinsèque est mesurée par la capacité clonogénique *in vitro* (Chavaudra, Bourhis, et Foray 2004). Le test de clonogénicité a été l'un des premiers mis en place (Puck, Marcus, et Cieciura 1956; 1956). Son principe repose sur la capacité des cellules de former des colonies. Des courbes dose/effet sont ainsi établies et suivent la plupart du temps le modèle linéaire quadratique (Franken et al. 2006; Nuryadi et al. 2018). Cette équation est déterminée par des paramètres : α , β , où α/β traduit la sensibilité des tissus aux RI. La fraction survivante à 2 Gy (SF2) peut aussi être calculée et celle-ci est généralement corrélée à l'efficacité du traitement (Fertil et Malaise 1981). Parmi les autres tests utilisés pour évaluer la radiosensibilité intrinsèque, on peut citer la cytogénétique utilisée pour l'identification des aberrations chromosomiques (chromosomes dicentriques, anneaux acentriques) produites à la suite de CDB non réparées. La difficulté de comptage et d'interprétation de ce test le rend complexe à mettre en œuvre. Le test des comètes a été développé par Singh *et al.* (Singh et al. 1988). *In fine*, cette technique permet d'évaluer les dommages à l'ADN, la cinétique de leur réparation et la quantité de dommages résiduels. Les avantages de ce test sont la rapidité et sa sensibilité pour la détection des cassures d'ADN (Bajpayee, Kumar, et Dhawan 2019; Pu, Wang, et Klaunig 2015; Collins 2004). Le test des micronoyaux est réalisé notamment sur les lymphocytes et permet d'évaluer les dommages liés à l'irradiation. Les micronoyaux peuvent provenir soit de la cassure de chromosomes (clastogène), soit de la perte de chromosome (aneugène). L'avantage de cette technique est sa sensibilité et la facilité de son application dans différents modèles d'études. Ce test permet d'avoir plusieurs informations : fréquence et distribution des micronoyaux et pourcentage de cellules binucléés (Costa et al. 2016; Decordier, Mateuca, et Kirsch-Volders 2011; Fenech 2000). Le nombre d'histones phosphorylés H2AX après irradiation peut être mesuré et est en corrélation avec les CDB. Cependant, le dénombrement est complexe car certaines dérégulations au sein de la chromatine rendent les foci moins « lisibles ». De plus, une disparition des foci δ -H2AX a été constatée dans certaines cellules radiosensibles ce qui génère une difficulté de quantification (Granzotto et al. 2011).

2.1.2. L'administration de la dose

La façon d'administrer la dose totale nécessaire pour stériliser les tumeurs est primordiale en RT. Deux paramètres jouent : l'étalement et le fractionnement de la dose. L'étalement

correspond à la durée totale d'un traitement par RT. Les cellules tumorales proliférant rapidement, la réduction de l'étalement conduit à une plus grande mortalité de ces cellules. Le fractionnement traduit la dose administrée par séance et le temps entre chaque séances lors d'un traitement par RT (Cosset 2010). En RT conventionnelle, il est généralement de 2 Gy/jour. Il permet ainsi de protéger les organes à risque dont les cellules ont le temps de réparer leurs lésions. Il permet aussi un meilleur contrôle de la tumeur puisque les cellules cancéreuses ont plus de difficultés à réparer les dommages engendrés par les RI (Bourhis et al. 1997) (Figure 19).

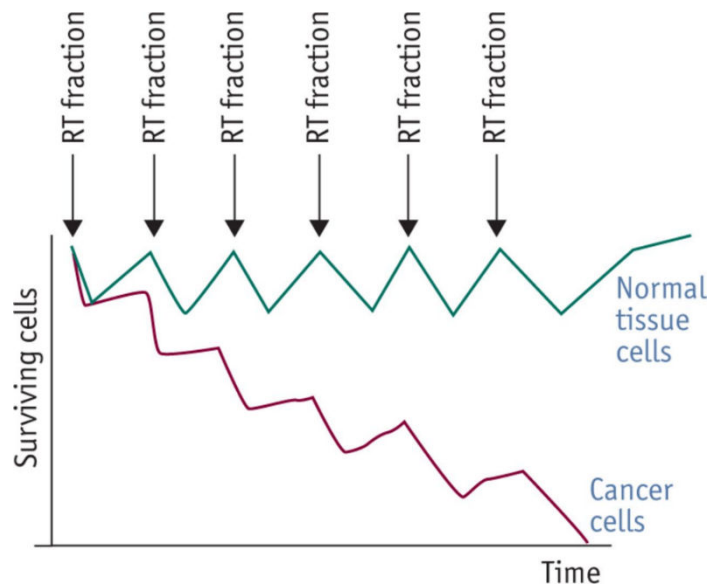


Figure 19. Schéma représentant l'effet différentiel tumeurs/tissus sains lié au fractionnement de la dose en RT. D'après (Putora, Früh, et Kern 2011).

Le nombre de fractions peut être augmenté (hyperfractionnement) avec des doses de 1,1 ou 1,2 Gy administrées en 2 ou 3 séances quotidiennes avec un espacement supérieur à 4-6h entre chaque séance (Bourhis et al. 2006). Ce type de fractionnement est utilisé dans le but de diminuer les risques de complication au niveau des tissus à faible prolifération. A l'inverse, le nombre de fractions peut être diminué (hypofractionnement), la dose par séance est alors augmentée (> 2 Gy) dans le but de diminuer le nombre de jours de traitement. Ce type de fractionnement est utilisé dans le cas des métastases et des urgences radiothérapeutiques mais l'inconvénient de son utilisation est l'augmentation du risque de séquelles au niveau des tissus sains. Au final, la dose totale administrée est aussi importante puisqu'elle sera limitée par la présence de tissus sains autour de la tumeur. En effet, le volume irradié est également un paramètre important à prendre en compte lors d'une RT. De manière générale, la taille de la structure irradiée est en corrélation avec le degré de toxicité observé. De plus, selon le type de

tissus, les effets diffèrent : les tissus en parallèle (poumons, rein, foie) ont des unités fonctionnelles indépendantes et sont moins sensibles tandis que les tissus en série (système nerveux central, moelle épinière, tube digestif) sont dépendants de celui en amont et sont donc plus sensibles (Cosset 2010; Tubiana et al. 2008).

2.1.3. La qualité du rayonnement

Lors d'un traitement par RT, il est aussi important de tenir compte de la qualité des rayonnements. En effet, la nature ou l'énergie des rayonnements va conditionner leur efficacité (Paganetti 2014; Schneider et al. 2016). Le TEL permet d'estimer la densité d'ionisation, et ainsi, de prédire la capacité d'un type de rayonnement à produire des dommages biologiques (Rithidech et al. 2010). De même, l'EBR est un paramètre primordial puisqu'il permet de moduler la planification des traitements (TPS, Treatment Planning System). L'ICRU (International Commission on Radiation Units and Measurements) a défini l'EBR comme le ratio de la dose du rayonnement de référence (D_{ref}) que l'on compare à la dose absorbée du rayonnement que l'on étudie (D_{test}) tel que : $EBR = D_{ref} / D_{test}$. Ainsi, un rayonnement présentant une EBR supérieur à 1 sera plus efficace pour stériliser les tumeurs que le traitement de référence. Cependant, il faudra là aussi tenir compte des EBR dans les différents tissus sains traversés.

2.1.4. L'effet oxygène

L'efficacité d'un traitement par RT est conditionnée par la quantité d'oxygène présente dans la cellule. En effet, plus une cellule est bien oxygénée, plus le traitement est efficient. Lorsqu'il s'agit de cellules hypoxiques ayant une faible teneur en oxygène, il est nécessaire d'augmenter la dose ou de procéder à la réoxygénation afin de les traiter. L'hypoxie entraîne donc le phénomène de radiorésistance et constitue un enjeu thérapeutique. Afin de limiter l'influence de cette dernière sur la radiosensibilité, le nimorazole (pour mimer l' O_2) et le gadolinium ont montré leur efficacité en tant que radiosensibilisateurs (Lartigau, Dewas, et Gras 2008). Des études sont en cours afin de trouver des moyens de détection de la présence d'une ou de plusieurs zones hypoxiques par imagerie non invasive pour la détection des tissus tumoraux (Alam et al. 2015). D'autres études cherchent à cibler certains biomarqueurs spécifiques de l'hypoxie tels que le facteur HIF-1 et des cellules endothéliales (Lartigau, Dewas, et Gras 2008; Cuenod et Balvay 2013) ou encore des biomarqueurs tumoraux visant à évaluer le statut

hypoxique et prolifératif de la tumeur par TEP (Differding, Hanin, et Grégoire 2015) tel que le FMISO (18F-misonidazole), le radiotracteur le plus connu (Bowen et al. 2011).

2.1.5. Le cycle cellulaire

La radiosensibilité est considérée comme maximale pendant les phases G2 et M et minimale dans la phase S. Cette différence est une résultante de l'exposition aux rayonnements qui va entraîner un ralentissement dans la progression du cycle cellulaire (C. Hennequin, Quero, et Favaudon 2008). En effet, les lésions radioinduites générées suite à l'interaction des rayonnements avec la matière sont prises en charge par les systèmes de réparation homologues afin d'éviter la formation des CDB. Ainsi, les cassures chromosomiques non réparées se retrouvent en phase G2-M. Par conséquent, les cellules deviennent plus radiosensibles durant cette phase (Tubiana et al. 2008). La synchronisation en G2 a été étudiée afin d'augmenter l'efficacité de la RT mais elle est à double tranchant car les cellules saines seraient également synchronisées ce qui réduirait le ratio thérapeutique. Cependant, des études montrent que, dans les cellules humaines, la phase G1 constitue aussi un point de radiosensibilité important avec des variations très importantes d'une lignée à l'autre. Ces variations sont liées à l'efficacité de la réparation et sont corrélées avec le taux de cassures chromosomiques non réparées (C. Hennequin, Quero, et Favaudon 2008).

2.2. Intérêt de la protonthérapie

L'hadronthérapie représente une rupture technologique. C'est une alternative de la radiothérapie pour le traitement des cancers inopérables et radio-résistants. Le terme hadron est utilisé en radiothérapie (RT) pour les neutrons et les protons qui sont les constituants des noyaux et par extension pour les noyaux atomiques légers comme les atomes d'hélium, d'oxygène et de carbone connus aussi sous le terme d'ions légers ou ions lourds pour le néon et l'argon (Tommasino et Durante 2015). Le concept de l'utilisation des hadrons en cancérologie, fondé sur leurs propriétés balistiques et radiobiologiques pour les particules de TEL élevé, a été proposé dès 1946 (Wilson 1946) et les premiers traitements chez l'homme ont été réalisés dès 1954 à Berkeley (USA) par protons et dès 1957 par ions légers. Les hadrons sont caractérisés par un TEL et une EBR élevés (Loeffler et Durante 2013).

2.2.1. La précision balistique des protons

Contrairement aux RT classiques qui délivrent une forte dose initiale dès l'entrée dans la matière avant de diminuer en fonction de la profondeur libérant ainsi une énergie non négligeable en amont et en aval de leur cible, les protons déposent une quantité d'énergie maximale à une profondeur précise. Ce dépôt d'énergie caractéristique des hadrons est appelé le pic de Bragg. En amont de ce pic, leur parcours décrit une phase de plateau tandis qu'en aval du pic, il existe une queue de fragmentation (Figure 20). Ces propriétés permettent de traiter les tumeurs en profondeur tout en épargnant les tissus sains voisins des irradiations (Mohan et Grosshans 2017; Patyal 2007; Laurent 2018). La protonthérapie est ainsi utilisée dans la plupart des cas pour le traitement de tumeurs dont la localisation est critique à savoir, les tumeurs pédiatriques, oculaires ou celle à la base du crâne (Figure 21).

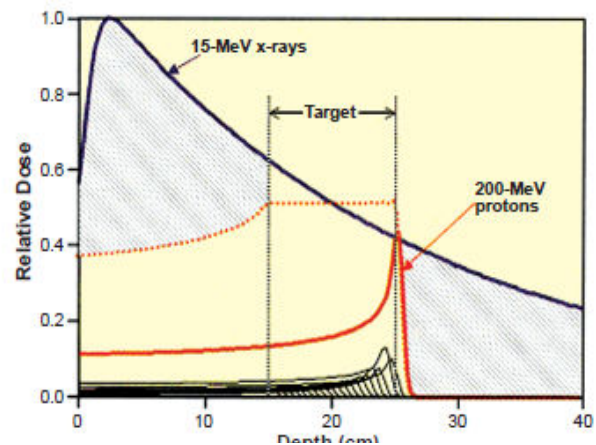


Figure 20. Courbes représentant la dose relative en fonction de la profondeur. D'après (Patyal et al. 2007).

Enfin, les protons présentent une faible dispersion latérale conduisant à une pénombre réduite. La pénombre correspond à la distance latérale entre le point à 80% et le point à 20% de la dose maximale par rapport à l'axe du faisceau.

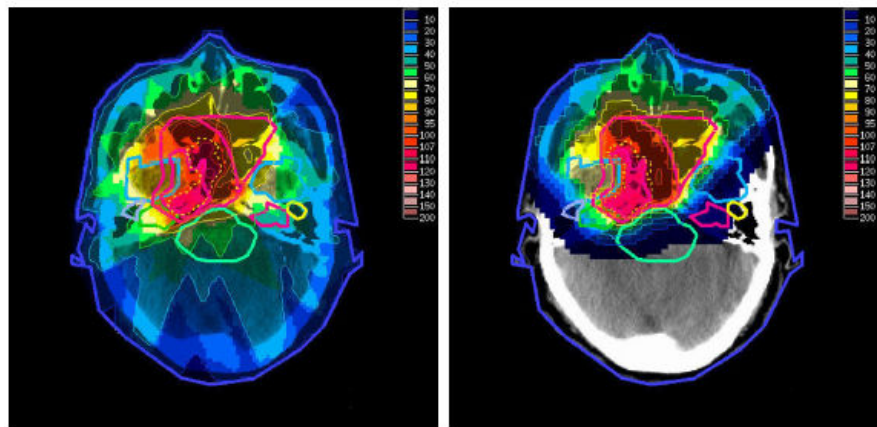


Figure 21. Comparaison de la dose reçue après traitement par IMRT (photons ; gauche) vs IMPT (protons ; droite) d'un carcinome nasopharyngé. D'après (Taheri-Kadkhoda et al. 2008).

2.2.2. Le TEL et l'EBR des protons

On distingue deux types de RI utilisés dans la pratique clinique : les rayonnements de bas TEL (jusqu'à environ 10 keV/ μm) dont la densité d'ionisation est faible et ceux à haut TEL comme les ions lourds (jusqu'à plusieurs centaines de keV/ μm) avec une densité d'ionisation élevée le

long du trajet. Le TEL moyen pour les faisceaux médicaux du centre de protonthérapie d'Orsay est d'environ une dizaine de $\text{keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$. Il se situe donc entre les bas et hauts TEL. De même, des expérimentations réalisées *in vitro* ont permis de déterminer l'EBR de différentes particules. Ainsi, l'EBR des protons a été évaluée à 1,1 représentant donc une faible augmentation de l'efficacité par rapport aux photons (Paganetti 2002; 2014). Celle-ci pourrait toutefois être sous-estimée dans la partie distale du pic de Bragg (Chen et Ahmad 2012) (Figure 22). On peut donc penser que l'utilisation d'une EBR constante de 1,1 en PT n'est pas appropriée, surtout lorsque la partie distale du pic de Bragg est proche d'organes à risque (OAR).

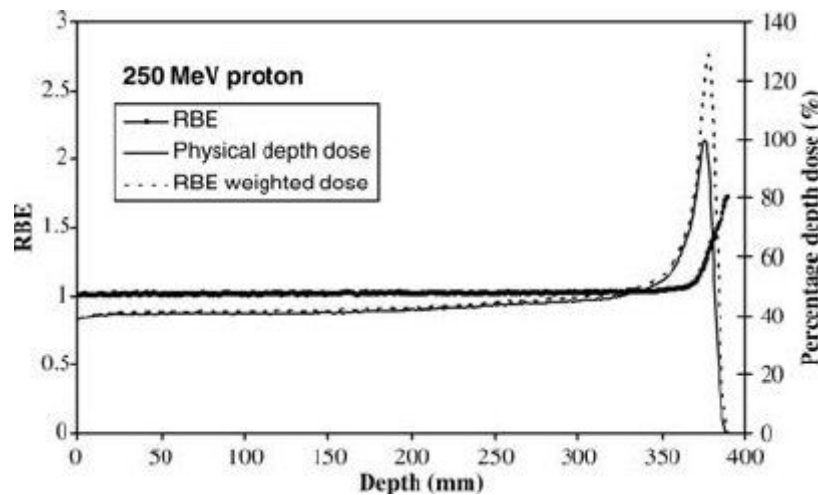


Figure 22. EBR d'un faisceau de protons à 250 MeV en fonction de la profondeur. D'après (Chen et Ahmad 2012).

2.2.3. Les clusters de lésions de l'ADN induits par les protons

Les lésions de l'ADN induites par les protons sont là-aussi intermédiaires entre les photons et les particules. Contrairement aux irradiations par les photons, celles-ci se produiront en clusters qui resteront plus diffus qu'avec les ions carbone par exemple (Figure 23).

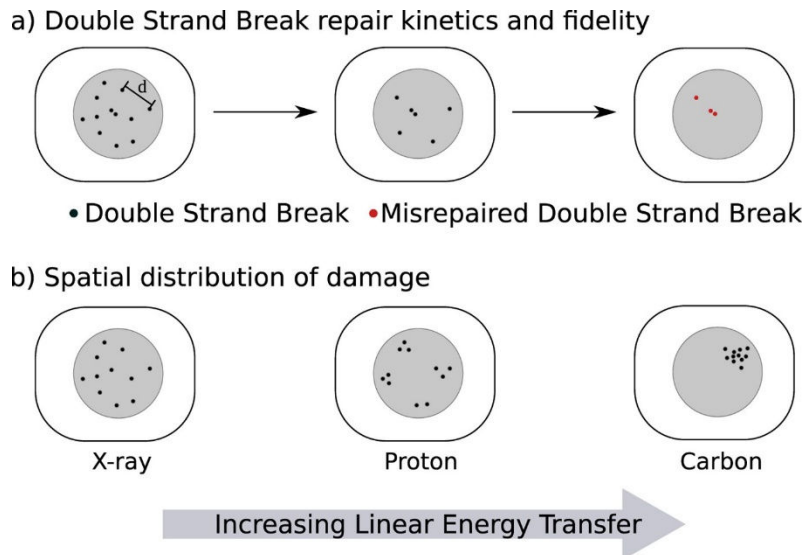


Figure 23. Schéma représentant la cinétique de réparation des CDB et leur distribution spatiale. D'après (McMahon et al. 2017).

La présence de sites multilésés serait un critère expliquant l'efficacité de l'irradiation aux ions. En effet, on sait que le nombre de sites multilésés augmentent avec le TEL et qu'ils sont plus difficilement réparés (Mustonen et al. 1999). Ainsi, l'exposition aux protons conduit à une augmentation du nombre de CDB résiduelles dans des cellules cancéreuses et normales (Moertel et al. 2004) (Figure 24).

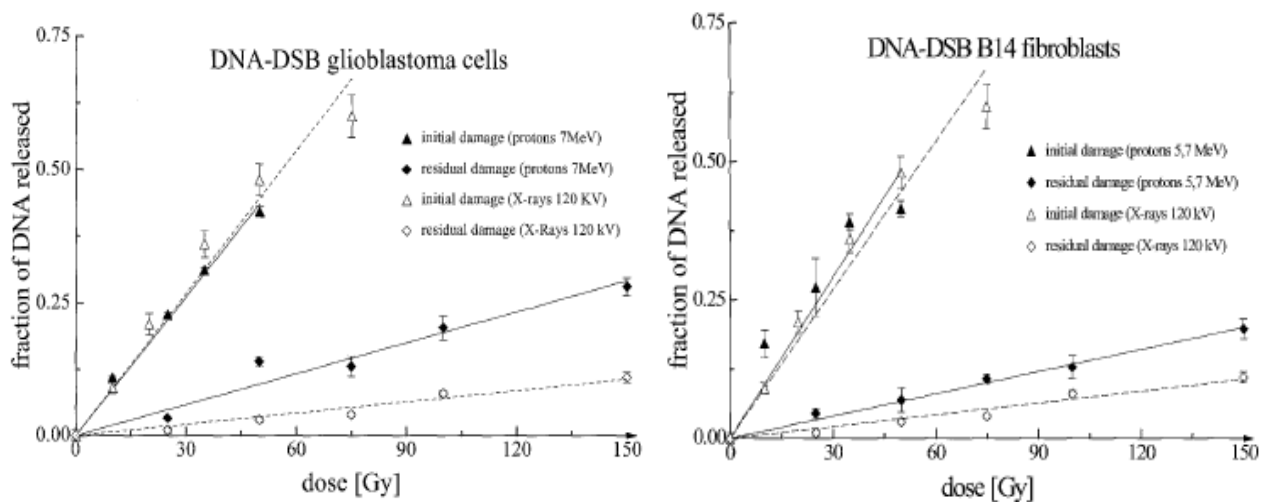


Figure 24. Fraction d'ADN libéré dans des cellules cancéreuses ou dans des fibroblastes normaux après exposition à des protons ou à des rayons X. D'après (Moertel et al. 2004).

Concernant les dommages initiaux de l'ADN, les résultats des études sont contradictoires. En effet, la complexité des CDB induites par les protons n'est pas forcément corrélée à un plus grand nombre de cassures. Green *et al.* (Green et al. 2001) et Calugaru *et al.* (Calugaru et al.

2011) ont montré une plus forte induction de CDB après protons comparé aux photons alors que les travaux de *Prise et al.* (Prise et al. 1990), *Jenner et al.* (Jenner et al. 1992), *Belli et al.* (Belli et al. 1994; 2000) et de *Moertel et al.* (Moertel et al. 2004) n'ont montré aucune différence. Les études semblent globalement montrer que les protons à très bas TEL induiraient plus de lésions alors que ce ne serait pas le cas pour les protons de TEL moyen ($\sim 3 \text{ keV}\cdot\mu\text{m}^{-1}$) (Leloup et al. 2005).

2.2.4. L'effet oxygène en PT

On sait que les cellules tumorales hypoxiques sont réoxygénées au cours des différentes fractions de la radiothérapie et cette réoxygénation joue un rôle important sur l'efficacité du traitement (Suit, Howes, et Hunter 1977). En effet, en présence d'oxygène, des phénomènes oxydatifs sont susceptibles de se produire. Peu d'études se sont intéressées aux phénomènes oxydatifs après irradiation par des ions. *Wan et al.* (Wan et al. 2005) ont montré que la production d'ERO dans des cellules épithéliales humaines avait lieu dans une proportion identique après irradiation aux protons ou aux rayons X. De plus, l'utilisation d'antioxydants a permis la protection contre les effets biologiques des protons *in vitro* (Wan et al. 2006) et *in vivo* (Guan et al. 2006) ce qui tend à montrer l'importance du stress oxydatif. Le calcul de l'OER (Oxygen Enhancement Ratio) permet d'évaluer l'importance de l'effet oxygène selon le type de rayonnements. Il correspond à la dose en condition hypoxique divisée par la dose en condition normoxique pour obtenir le même taux de survie. Il se situe autour de 3 pour la RT conventionnelle et diminue ensuite quand le TEL augmente (Figure 25).

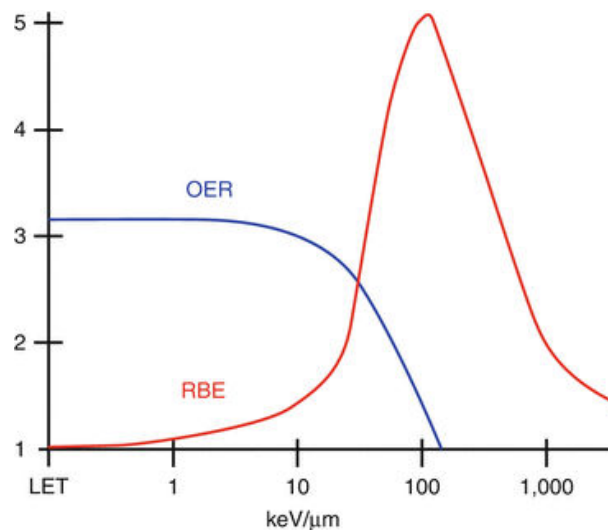


Figure 25. OER et EBR en fonction du TEL. D'après (Chang et al. 2014).

2.2.5. L'hypofractionnement de la PT

Le rôle du facteur temps en RT est primordial. L'hypofractionnement consiste en une plus forte dose de rayonnements donnée par fraction, diminuant ainsi le nombre de jours nécessaires à la PT. L'inconvénient potentiel est que l'hypofractionnement peut conduire à une augmentation des toxicités tardives dans les tissus sains autour de la tumeur. Aux Etats-Unis, il est de plus en plus utilisé pour les cancers du sein, des poumons, du foie et de la prostate (Bush et al. 2013; 2014; 2016; Slater et al. 2019). Les taux de contrôle et de survie ont été maintenus et l'apparition de séquelles n'a pas augmenté.

Dans un modèle murin, il a été montré que la dose nécessaire à l'apparition d'une desquamation humide de la peau augmentait avec le nombre de fractions pour un TEL élevé (50 à 100 keV/μm) mais ce n'était pas le cas pour des TEL allant de 14 à 40 keV/μm (Ando et al. 1998) (Figure 26).

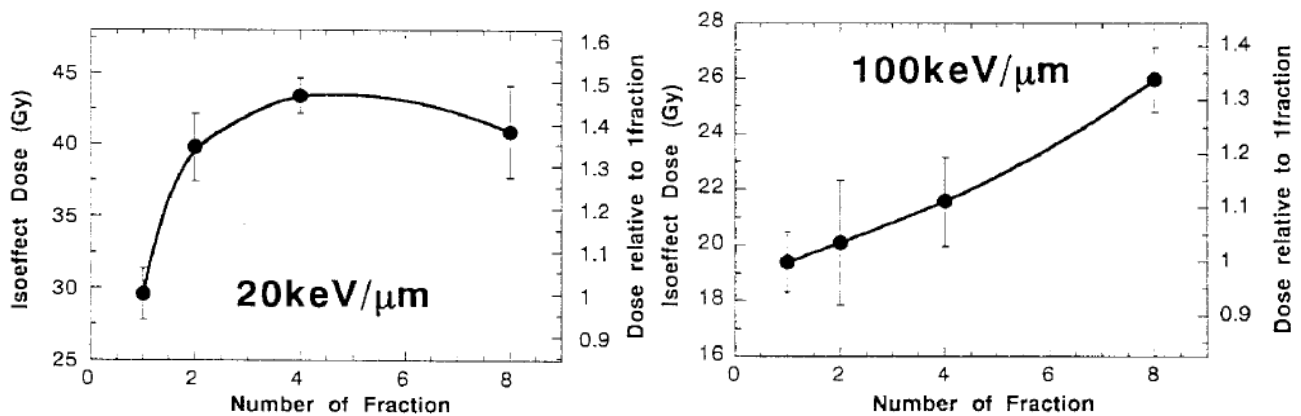


Figure 26. Dose d'irradiation nécessaire pour obtenir un score de réaction de la peau de 3 (légère desquamation humide) après exposition à des ions carbone de 20 keV/μm (gauche) ou de 100 keV/μm (droite). D'après (Ando et al. 1998).

2.2.6. Application en clinique

Du fait des leurs propriétés balistiques intéressantes, les protons sont largement utilisés en clinique dans le cadre du traitement de nombreuses tumeurs radio-résistantes. La PT a montré une grande efficacité notamment pour le traitement des tumeurs : de l'œil, à la base de crâne, des sinus nasaux/paranasaux et pédiatriques (Doyen et al. 2016) (Tableau 3).

ADULTES	Nombre de patients
GLANDES SALIVAIRES	20
SINUS DE LA FACE	10
SINUS DE LA FACE, EXTENSION CRANIENNE	20
MENINGIOMES AGRESSIFS / MALINS	50
CHORDOMES CRANE & RACHIS	30
CHONDROSARCOMES CRANE & RACHIS	30
SARCOMES TISSUS MOUS (pelvis, abdomen)	30
CAVUM, EXTENSION CRANIENNE 20 / 7	5
ŒIL	10
INDICATIONS POTENTIELLES *	50
TOTAL ADULTES	255
ENFANTS	Nombre de patients
SARCOMES TISSUS MOUS (orbite, para méningés, pelvis)	20
TUMEURS CEREBRALES	20
TUMEURS CEREBRALES avec anesthésie générale	10
NEUROBLASTOMES avec anesthésie générale	15
SARCOMES OSSEUX (Ewing...)	15
AUTRES (rétinoblastomes, néphroblastomes...)	5
AUTRES (rétinoblastomes...) avec anesthésie générale	5
TOTAL ENFANTS	90
TOTAL PATIENTS	345

Tableau 3. Tableau des principales localisations tumorales traitées par PT au centre ARCHADE. D'après le Pr. Jean-Louis Habrand.

Il existe environ 80 centres de protonthérapie dans le monde parmi eux 3 centres de protonthérapie à l'échelle nationale : Orsay, Nice et récemment l'ouverture du centre ARCHADE (Advanced Resource Centre HADrontherapy in Europe) à Caen. Le traitement se fait soit en faisceau diffusé ou balayé à Orsay et uniquement en faisceau balayé à Nice et Caen.

2.3. Génération et délivrance des faisceaux de protons

La production d'un faisceau de protons (ou autres hadrons) nécessite une source d'ions. Ces ions sont injectés au centre du cyclotron. Leur trajectoire décrit ensuite une spirale grâce à un champ magnétique. Ils sont accélérés par un champ électrique à haute fréquence avant d'être éjectés vers leur cible. En PT, il existe 2 modes de délivrance du faisceau : la technique passive ou le balayage.

2.3.1. La diffusion passive : Double Scattering (DS)

La technique du faisceau diffusé ou passif, appelée Double Scattering (DS), permet de diffuser le faisceau fixe au moyen de modulateurs et de compensateurs et ainsi de produire un faisceau élargi ce qui permet une bonne conformation latérale et distale du volume cible (Figure 27).

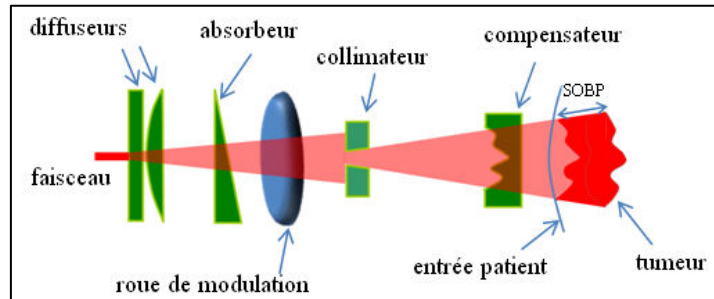


Figure 27. Schéma du dispositif expérimental utilisé pour le mode de délivrance en DS (Double Scattering). D'après (Courtois 2011).

2.3.2. Le balayage du faisceau : Pencil Beam Scanning (PBS)

La technique du faisceau balayé ou actif appelée Pencil Beam Scanning (PBS) est la plus avancée. Elle consiste à moduler l'énergie et à diriger le faisceau à l'aide d'un système magnétique afin de traiter un volume tumoral (Figure 28).

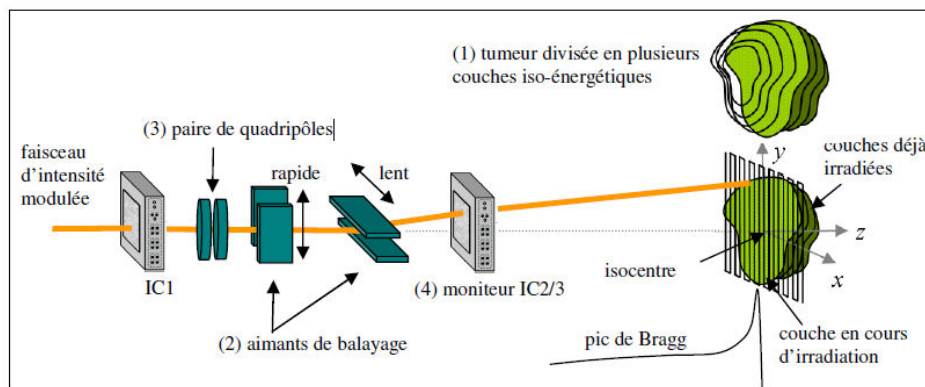


Figure 28. Schéma du dispositif expérimental utilisé pour le mode de délivrance en PBS (Pencil Beam Scanning). D'après (Courtois 2011).

Cette technique de délivrance des faisceaux de protons est l'une des plus vendues actuellement. Afin de délivrer la dose choisie, elle nécessite l'accumulation de pics de Bragg pour atteindre la dose souhaitée (cf. Figure 20 p. 36). Cependant, elle entraîne aussi l'addition des phases plateau précédant le pic de Bragg sur les tissus sains situés en amont de la tumeur.

Il existe également une technique de balayage par mini-faisceaux. Dans ce cas, la dose est délivrée en spots : des pics de Bragg sont distribués transversalement et longitudinalement et le faisceau est éteint le temps de modifier les paramètres.

CHAPITRE 2. Les effets secondaires de la radiothérapie sur les tissus sains

1. Organisation des tissus sains

1.1. Les tissus compartimentaux

Les tissus compartimentaux comprennent 3 compartiments disposés en série (Figure 29) :

- le compartiment des cellules souches qui contient des cellules indifférenciées qui subissent de nombreuses mitoses,
- le compartiment de maturation qui contient des cellules en cours de différenciation,
- le compartiment de cellules différenciées ne se divisant plus.

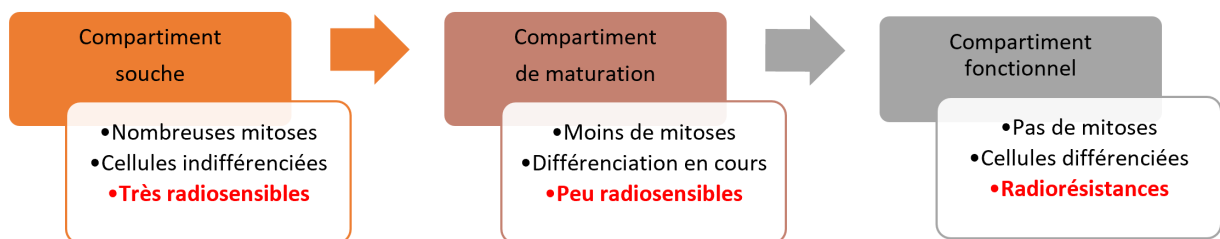


Figure 29. Schéma de l'organisation des tissus compartimentaux.

Ces tissus suivent la loi de Bergonié-Tribondeau (Bergonié et Tribondeau 2003) (cf. Chap 1 2.2.1): le premier compartiment est très radiosensible, le deuxième l'est peu et le dernier est radiorésistant.

Parmi les tissus compartimentaux, on peut citer en exemple la moelle osseuse, les épithéliums, les gonades etc. La destruction d'un compartiment de cellules souches suite une exposition aux RI dépend du délai d'apparition du déficit fonctionnel de l'organe qui dépend à son tour de la durée de vie des cellules différenciées et qui peut être variable allant de quelques jours à plusieurs mois. Par exemple, il a été constaté que l'irradiation médullaire totale induit, quelques jours après, l'apparition d'une leucopénie et d'une thrombopénie et, seulement 120 jours après, l'apparition d'une anémie. Concernant l'épiderme, l'irradiation, ayant pour conséquence la destruction des cellules souches, engendre 3 semaines après, l'apparition de l'épithélite exsudative (Cosset 2010).

1.2. Les tissus non-compartimentaux

Contrairement aux tissus compartimentaux, ces tissus sont non-hiérarchisés et ne contiennent pas de cellules souches individualisées. Les cellules constituant ces tissus possèdent un rôle

fonctionnel qui leur permet de rentrer en mitose afin de renouveler les cellules mortes. Les lésions après RI vont entraîner une mortalité cellulaire qui est tolérée jusqu'à un certain seuil. Une fois dépassé, des signaux sont envoyés par voie humorale aux autres cellules de l'organe afin de stimuler les cellules à entrer en mitose pour compenser le déficit cellulaire. Une fois les cellules régénérées, des signaux d'inhibition permettent l'arrêt des mitoses. Les exemples des tissus non compartimentaux : foie, rein, tissu nerveux et endothélium vasculaire (Cosset 2010).

2. Les effets secondaires

On distingue deux types d'effets secondaires après RT : les effets secondaires stochastiques et les effets secondaires déterministes (Figure 30). Les effets secondaires stochastiques (ou probabilistes) apparaissent tardivement après l'irradiation. Il s'agit surtout des seconds cancers apparaissant au niveau de la zone précédemment irradiée et qui concerne environ 1 à 2% des patients traités par RT. L'existence d'une dose-seuil reste discutée. La probabilité d'apparition de ces effets secondaires est corrélée avec l'augmentation de la dose reçue (Figure 30, droite). Les effets déterministes, aussi appelés non-stochastiques, sont « obligatoires » et ont été décrits par Röntgen. Ils apparaissent au-delà d'une dose-seuil et leur gravité est corrélée à la dose reçue (Choudhary 2018; Cosset 2010) (Figure 30, gauche). Ils peuvent survenir à des temps précoces ou tardifs après RT et sont difficile à prédire (déterministes) : variations d'un individu à l'autre, temps d'exposition, dose et type de rayonnement (Choudhary 2018).

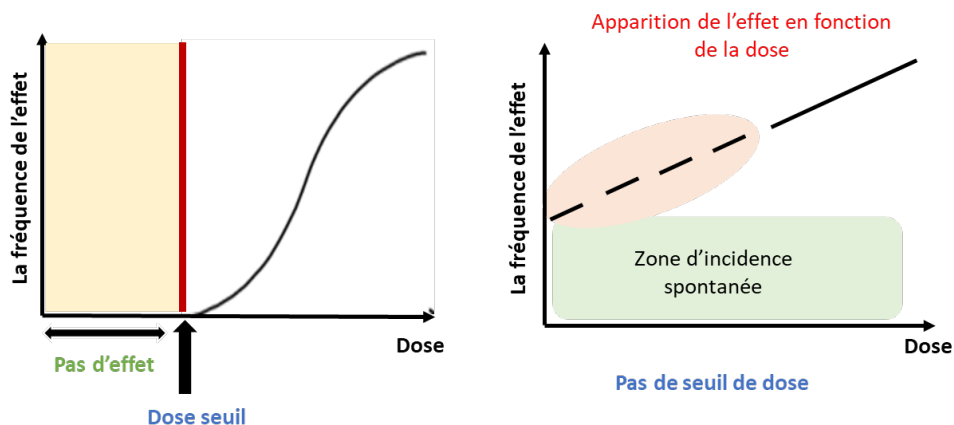


Figure 30. Les effets déterministes (gauche) et stochastiques (droite).

2.1. Les effets tissulaires précoces

Les effets tissulaires précoces sont des effets qui surviennent dans les 6 mois après la première séance de radiothérapie (Cosset 2010). Ils sont classés par grade (RTOG) selon leur gravité (Tableau 4).

Tissue	Grade 1	2	3	4
Skin	Follicular, faint or dull erythema / epilation / dry desquamation / decreased sweating	Tender or bright erythema, patchy moist desquamation / moderate edema	Confluent, moist desquamation other than skin folds, pitting edema	Ulceration, hemorrhage, necrosis
Mucous membrane	Irritation / may experience mild pain not requiring analgesic	Patchy mucositis that may produce an inflammatory serosanguinous discharge / may experience moderate pain requiring analgesia	Confluent fibrinous mucositis / may include severe pain requiring narcotic	Ulceration, hemorrhage or necrosis
Eye	Mild conjunctivitis w/ or w/o scleral injection / increased tearing	Moderate conjunctivitis w/ or w/o keratitis requiring steroids and/or antibiotics / dry eye requiring artificial tears / iritis with photophobia	Severe keratitis with corneal ulceration / objective decrease in visual acuity or in visual fields / acute glaucoma / panophthalmitis	Loss of vision (uni or bilateral)
Ear	Mild external otitis with erythema, pruritus, secondary to dry desquamation not requiring medication. Audiogram unchanged from baseline	Moderate external otitis requiring topical medication / serous otitis media / hypoacusis on testing only	Severe external otitis with discharge or moist desquamation / symptomatic hypoacusis / tinnitus, not drug related	Deafness
Salivary gland	Mild mouth dryness / slightly thickened saliva / may have slightly altered taste such as metallic taste / these changes not reflected in alteration in baseline feeding behavior, such as increased use of liquids with meals	Moderate to complete dryness / thick, sticky saliva / markedly altered taste	(none)	Acute salivary gland necrosis
Pharynx & esophagus	Mild dysphagia or odynophagia / may require topical anesthetic or non-narcotic analgesics / may require soft diet	Moderate dysphagia or odynophagia / may require narcotic analgesics / may require puree or liquid diet	Severe dysphagia or odynophagia with dehydration or weight loss > 15% from pretreatment baseline requiring NG feeding tube, IV fluids, or hyperalimentation	Complete obstruction, ulceration, perforation, fistula
Larynx	Mild or intermittent hoarseness / cough not requiring antitussive / erythema of mucosa	Persistent hoarseness but able to vocalize / referred ear pain, sore throat, patchy fibrinous exudate or mild arytenoid edema not requiring narcotic / cough requiring antitussive	Whispered speech, throat pain or referred ear pain requiring narcotic / confluent fibrinous exudate, marked arytenoid edema	Marked dyspnea, stridor or hemoptysis with tracheostomy or intubation necessary
Upper GI	Anorexia with ≤ 5% weight loss from pretreatment baseline / nausea not requiring antiemetics / abdominal discomfort not requiring parasympatholytic drugs or analgesics	Anorexia with ≤ 15% weight loss from pretreatment baseline / nausea and/or vomiting requiring antiemetics / abdominal pain requiring analgesics	Anorexia with > 15% weight loss from pretreatment baseline or requiring NG tube or parenteral support. Nausea and/or vomiting requiring tube or parenteral support / abdominal pain, severe despite medication / hematemesis or melena / abdominal distention (flat plate radiograph demonstrates distended bowel loops)	Ileus, subacute or acute obstruction, perforation, GI bleeding requiring transfusion / abdominal pain requiring tube decompression or bowel diversion
Lower GI / Pelvis	Increased frequency or change in quality of bowel habits not requiring medication / rectal discomfort not requiring analgesics	Diarrhea requiring parasympatholytic drugs (e.g. Lomotil) / mucous discharge not necessitating sanitary pads / rectal or abdominal pain requiring analgesics	Diarrhea requiring parenteral support / severe mucous or blood discharge necessitating sanitary pads / abdominal distention (flat plate radiograph demonstrates distended bowel loops)	Acute or subacute obstruction, fistula or perforation; GI bleeding requiring transfusion; abdominal pain or tenesmus requiring tube decompression or bowel diversion
Lung	Mild symptoms of dry cough or dyspnea on exertion	Persistent cough requiring narcotic, antitussive agents / dyspnea with minimal effort but not at rest	Severe cough unresponsive to narcotic antitussive agent or dyspnea at rest / clinical or radiological evidence of acute pneumonitis / intermittent oxygen or steroids may be required	Severe respiratory insufficiency / continuous oxygen or assisted ventilation
Genitourinary	Frequency of urination or nocturia twice pretreatment habit / dysuria, urgency not requiring medication	Frequency of urination or nocturia that is less frequent than every hour. Dysuria, urgency, bladder spasm requiring local anesthetic (e.g. Pyridium)	Frequency with urgency and nocturia hourly or more frequently / dysuria, pelvic pain or bladder spasm requiring regular, frequent narcotic / gross hematuria with/without clot passage	Hematuria requiring transfusion / acute bladder obstruction not secondary to clot passage, ulceration, or necrosis
Heart	Asymptomatic but objective evidence of EKG changes or pericardial abnormalities without evidence of other heart disease	Symptomatic with EKG changes and radiological findings of congestive heart failure or pericardial disease / no specific treatment required	Congestive heart failure, angina pectoris, pericardial disease responding to therapy	Congestive heart failure, angina pectoris, pericardial disease, arrhythmias not responsive to nonsurgical measures
CNS	Fully functional status (i.e. able to work) with minor neurological findings, no medication needed	Neurological findings present sufficient to require home care / nursing assistance may be required / medications including steroids/antiseizure agents may be required	Neurological findings requiring hospitalization for initial management	Serious neurological impairment that includes paralysis, coma, or seizures > 3 per week despite medication / hospitalization required
HEME	1	2	3	4
WBC	3.0 - < 4.0	2.0 - < 3.0	1.0 - < 2.0	< 1.0
Platelets	75 - < 100	50 - < 75	25 - < 50	< 25 or spontaneous bleeding
Neutrophils	1.5 - < 1.9	1.0 - < 1.5	0.5 - < 1.0	< 0.5 or sepsis
Hgb / Hct	11 - 9.5 (28% - < 32%)	< 9.5 - 7.5 (< 28%)	< 7.5 - 5.0 (Packed cell transfusion required)	(none)

Tableau 4. Classification des effets secondaires aigus selon le RTOG.

L'apparition de ces effets est corrélée à l'organisation tissulaire. En effet, ces réactions ont lieu principalement dans les tissus compartimentaux qui se distinguent par la présence de cellules indifférenciées et sont donc considérés comme étant des tissus à renouvellement rapide tels que : la peau qui se caractérise par l'apparition d'épithélite au bout de 3 semaines après irradiation, la moelle osseuse où la majorité des effets ont lieu quelques jours voire quelques mois après la RT ou encore les muqueuses ORL avec l'apparition de mucites (Dörr 2002; Cosset 2010). L'étalement de la dose de RT est un facteur essentiel à prendre en considération car il détermine l'« efficacité » de l'apparition des réactions aiguës. L'augmentation de l'étalement protège les tissus à renouvellement rapide par rapport aux tissus à renouvellement lent.

2.2. Les effets tissulaires tardifs

Contrairement aux effets précoces, les effets tardifs surviennent au-delà des 6 mois après la première irradiation. Ils sont hiérarchisés selon la classification RTOG (Tableau 5).

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

Tableau 5. Classification des effets secondaires tardifs selon le RTOG.

La vitesse de renouvellement cellulaire et la dose d'irradiation sont des facteurs qui jouent un rôle important dans l'apparition de ces effets. En effet, ces derniers apparaissent dans tous les tissus mais les tissus à prolifération lente sont principalement les plus affectés comme : le système nerveux central, l'épithélium tubulaire, l'endothélium vasculaire, les fibroblastes, les ostéoblastes et les chondroblastes (Tubiana et al. 2008). L'hyperfractionnement permettrait d'augmenter la dose totale délivrée sans majorer les effets secondaires aux tissus à renouvellement lent (Bourhis et al. 2006; Cosset 2010).

Les organes comprenant à la fois des tissus compartimentaux et non-compartimentaux pourront présenter successivement des effets précoces et des effets tardifs après irradiation. Les effets tardifs ne sont pas toujours précédés des effets précoces.

D'autres facteurs peuvent également être pris en compte dans l'apparition des effets secondaires après RT comme les prédispositions génétiques individuelles et les facteurs de comorbidités.

2.3. Focus sur les effets secondaires aux poumons, au cœur et à la peau

Les effets des rayonnements ionisants sur les tissus sont très variables du fait de la diversité des types cellulaires impliqués. Ils dépendent aussi du patient : sa radiosensibilité, son âge, son statut de fumeur, de diabétique, d'obésité, de nutrition (anémie), d'immunocompétence, d'infection, de problèmes de microcirculation, de syndrome ATM, Fanconi, de désordre des tissus conjonctifs etc. Ainsi, la tolérance des tissus varie considérablement et leur probabilité de survenue est parfois considérable (Tableau 7). Le développement d'une fibrose radioinduite reste l'atteinte la plus périlleuse (Cosset 2010).

Probabilité de survenue de l'effet (dose en Gy)			
		5%	50%
2-10 Gy			
Spermatogonie	Stérilité	1	2
Lymphocytes	Lymphopénie	2	10
Ovocytes	Stérilité	6	10
10-20 Gy			
Epithélium de la cornée	Cataracte	6	12
20-30 Gy			
Rein (glomérule)	Néphrosclérose	23	28
Poumons	Pneumopathie, fibrose	20	30
30-40 Gy			
Foie	Hépathopathie	35	40
40-50 Gy			
Cœur en totalité	Péricardite, pancardite	43	50
Intestin	Nécrose	50	55
50-60 Gy			
Moelle épinière	Myélopathie	50	60
Encéphale	Encéphalopathie	50	60
60-70 Gy			
Muqueuse (orale)	Ulcération	65	75
Vessie	Ulcération	65	75
Rectum	Ulcération	65	75
Os adulte	Fracture	65	70

Tableau 6. Dose de tolérance & effets secondaires développés au sein des tissus sains après irradiation chez l'homme. D'après (Tubiana et al. 2008).

2.3.1. Les effets secondaires pulmonaires

La RT est l'une des principales thérapies pour les tumeurs de la zone thoracique (cancers du poumon, de l'œsophage, tumeurs mammaires, lymphomes) (Huang et al. 2017). Les doses éventuellement reçues par les poumons lors de ces traitements peuvent, à terme, menacer la vie du patient. En effet, l'irradiation thoracique peut engendrer l'apparition avec un taux d'incidence entre 10-20% d'une pneumopathie radique. Les signes cliniques de cette pathologie sont : une opacification radiologique, une fièvre, une dyspnée, une toux, des douleurs thoraciques et une perturbation des tests fonctionnels respiratoires (Ortholan et Mornex 2010; Huang et al. 2017). Cette pathologie est le résultat de l'atteinte du parenchyme pulmonaire constitué principalement de pneumocytes I et II dont la sensibilité aux rayonnements est très variable (Tubiana et al. 2008). Nous pouvons observer que lors d'une réaction tardive à l'irradiation le développement d'une fibrose radio-induite qui est médiée par l'implication du

TGF- β et, et de l'IL-1 α et qui se caractérise par des altérations fonctionnelles notamment au niveau des alvéoles (Abratt et Morgan 2002) à travers le dépôt de la matrice extracellulaire (Huang et al. 2017). De manière générale, lors d'un traitement par RT, le volume pulmonaire ne doit pas recevoir une dose supérieure à 20 Gy (V20) ou 30 Gy (V30) afin de ne pas augmenter le risque de développement d'effets secondaires (Hanania et al. 2019).

Des études ont été réalisées afin de trouver des cibles thérapeutiques pour éviter l'apparition de ces complications après RT. En effet, l'administration dans un modèle murin du myrtol (Zhao et al. 2016) et de la rosiglitazone (agoniste du PPAR) (Mangoni et al. 2015) a montré un effet protecteur sur les tissus pulmonaires suite à l'irradiation.

2.3.2. Les effets secondaires cardiaques

La prescription d'un traitement de radiothérapie dans le cadre d'un cancer du sein, du poumon, de l'œsophage (Doyen, Giraud, et Belkacemi 2010) et pour le traitement du lymphome de Hodgkin (Eldabaje et al. 2015) entraîne dans certains cas l'apparition d'une toxicité cardiaque. Cette toxicité peut se manifester de manière aiguë par l'apparition de myopéricardite ou de manière tardive par l'apparition d'une péricardite, une insuffisance cardiaque diastolique et coronarienne (Armanious et al. 2018). Il est préconisé de ne pas dépasser une dose dans l'ensemble du cœur qui soit à supérieure à 35 Gy (Doyen, Giraud, et Belkacemi 2010). Des efforts ont été réalisés afin de mieux traiter les cancers tout en réduisant le risque de développement d'effets secondaires au niveau du cœur mais, malgré les progrès réalisés qui visent à détecter et à prédire la survenue des effets cardiotoxiques, beaucoup de données sont encore manquantes (Jacob et al. 2016; Armanious et al. 2018).

2.3.3. Les effets secondaires cutanés

La peau est la première barrière avant que les rayonnements ionisants ne pénètrent le corps humain et est constituée de différents types cellulaires dont les kératinocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales. Le traitement par RT induit dans la plupart des cas une toxicité cutanée qui peut se manifester par l'apparition de lésions précoces considérées comme provenant de l'atteinte de la couche basale proliférante de l'épiderme, et tardives, reliées aux atteintes du derme et de l'architecture tissulaire sous-jacente. L'importance des lésions précoces n'est pas corrélée à l'intensité des réactions tardives, les mécanismes en jeu étant différents. L'ensemble de cette description clinique constitue le syndrome cutané radiologique. Les signes cliniques d'une toxicité cutanée sont une pigmentation, une atrophie cutanée, l'apparition de

télangiectasies, d'une fibrose sous cutanée, voire dans les stades les plus grave d'une nécrose (Emami et al. 1991). Une dose de 45 Gy est préconisée à ne pas être dépassé en fractionnement afin d'éviter l'apparition des complications sévères (Ginot et al. 2010).

3. La toxicité de la protonthérapie aux tissus sains

3.1. La toxicité de la protonthérapie en clinique

L'apparition de toxicité précoce s'est avérée presque similaire en PT par rapport à la RT. Des études plus approfondies devraient être conduites afin de comparer les effets de ces 2 thérapies lorsque les conditions le permettent. Dans la littérature, une étude réalisée par Yock *et al.* (Yock et al. 2016) dans le cadre d'un traitement de patients par PT pour des médulloblastomes n'a montré aucune toxicité au niveau cardiaque, pulmonaire ou au niveau gastrique. En revanche, l'apparition d'une ototoxicité avec un déficit neuroendocrinien a été constatée (Yock et al. 2016). De plus, l'équipe de Romesser *et al.* a montré que le traitement par PT du cancer de la tête et du cou induisait moins de toxicité de grade 2 ou de dysgueusie aigue, de mucite et de nausées en comparaison avec le traitement par RT (Romesser et al. 2016). Si on s'intéresse plus précisément au traitement par PT des tumeurs pédiatriques, les résultats sont aussi mitigés. Certaines études montrent une diminution des toxicités tardives en comparaison de la RT conventionnelle (y compris l'IMRT) lors de traitement de tumeurs cérébrales (Yock et al. 2014; Kahalley et al. 2016; Bishop et al. 2014) et de tumeurs (neuro)endocrines (Eaton et al. 2016; Viswanathan, Pradhan, et Eugster 2011), ainsi qu'une diminution des toxicités aiguës (Song et al. 2014; Grant et al. 2015). D'autres études pédiatriques ne montrent en revanche aucune différence en terme de toxicité cérébrale après PT *versus* RT (Paulino et al. 2010). Enfin, au contraire, certaines études montrent une plus grande toxicité de la PT, par rapport à la RT, sur les tissus sains environnants la tumeur chez l'enfant dans le cas de tumeurs cérébrales (Gunther et al. 2015), de tumeurs tête et cou (Bölling et al. 2015) ou de tumeurs pulmonaires (Green et al. 2015).

Concernant le risque de développement de cancers secondaires, l'équipe de Chung *et al.* (Chung et al. 2013) s'est intéressée à l'induction des tumeurs secondaires à l'issue des traitements par PT ou aux rayons X sur une cohorte de 558 patients. Les résultats montrent que le risque de développer une tumeur maligne secondaires 6 ans après le traitement était plus faible chez les patients traités par protons (5.2% vs 7.5%) (Chung et al. 2013), résultat qui a été confirmés par

Sethi et al. (Sethi et al. 2014). La PT entraîne donc moins de risque d'apparition de seconds cancers en comparaison à la radiothérapie.

3.2. Les limites de la protonthérapie

Les toxicités observées en clinique sont liées aux limites de la protonthérapie. La physique des interactions des protons dans les tissus est relativement bien connue et présente des avantages (cf. Chapitre 1, paragraphe 2.2.). En revanche, des incertitudes persistent sur le parcours des protons (Figure 31). Elles sont liées à l'hétérogénéité des tissus traversés ainsi qu'aux calculs des paramètres dans les TPS (Treatment Planning Systems) (Lomax 2008).

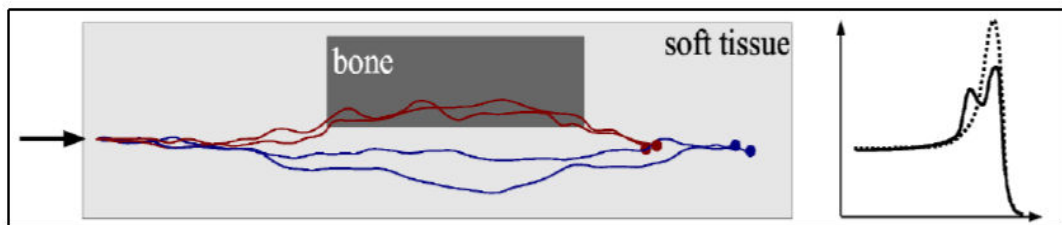


Figure 31. Schéma représentant l'hétérogénéité latérale des protons selon le tissu traversé (gauche) et le pic de Bragg théorique (pointillé) versus réel (droite). D'après (Lomax 2008).

Par ailleurs, afin de traiter un volume tumoral entier, le pic de Bragg est « étalé » par l'addition de faisceaux de protons. La dose choisie est ainsi délivrée au niveau de la tumeur grâce à l'accumulation des pics. Cependant, il existe aussi une addition des phases plateau précédant le pic de Bragg conduisant à une augmentation de la dose sur les tissus sains en amont de la tumeur (Figure 32).

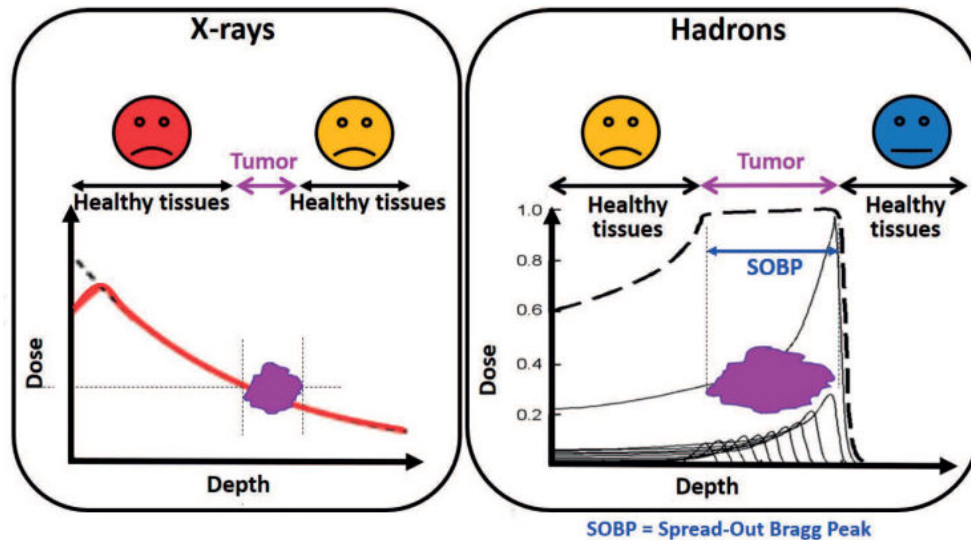


Figure 32. Dose déposée en fonction de la profondeur dans l'eau par des rayons X (gauche) ou par un pic de Bragg étalé d'hadrons (droite) afin de traiter tout le volume tumoral. D'après (Laurent 2018).

De plus, les faisceaux de protons peuvent être délivrés de 2 façons : passive (la méthode traditionnelle) ou active (nouvelle technique) (cf Chapitre1, paragraphe 2.3.). La technique passive est la plus ancienne : la dose est délivrée par un faisceau de protons et un système de collimateurs et de compensateurs permet de le conformer à la forme de la tumeur. Elle conduit à une dose excessive de rayonnements au niveau des tissus sains présents sur les côtés dans la partie proximale (Figure 33).

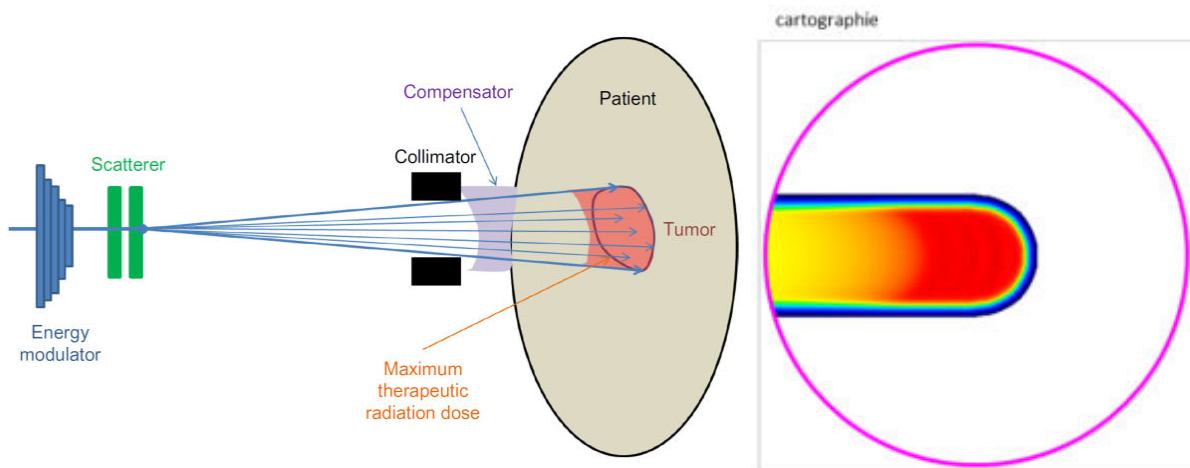


Figure 33. Illustration de la dose déposée (rouge) dans le cas de la technique passive de traitement par PT. D'après (Wang 2015) et Jean-Marc Fontbonne (LPC-Caen).

Mc Donald *et al.* (MacDonald et al. 2013) ont ainsi montré que des patientes traitées pour un cancer du sein gauche par un faisceau passif de protons recevaient une dose non-négligeable

sur un volume là aussi non-négligeable au niveau du cœur et surtout du poumon gauche (Figure 34).

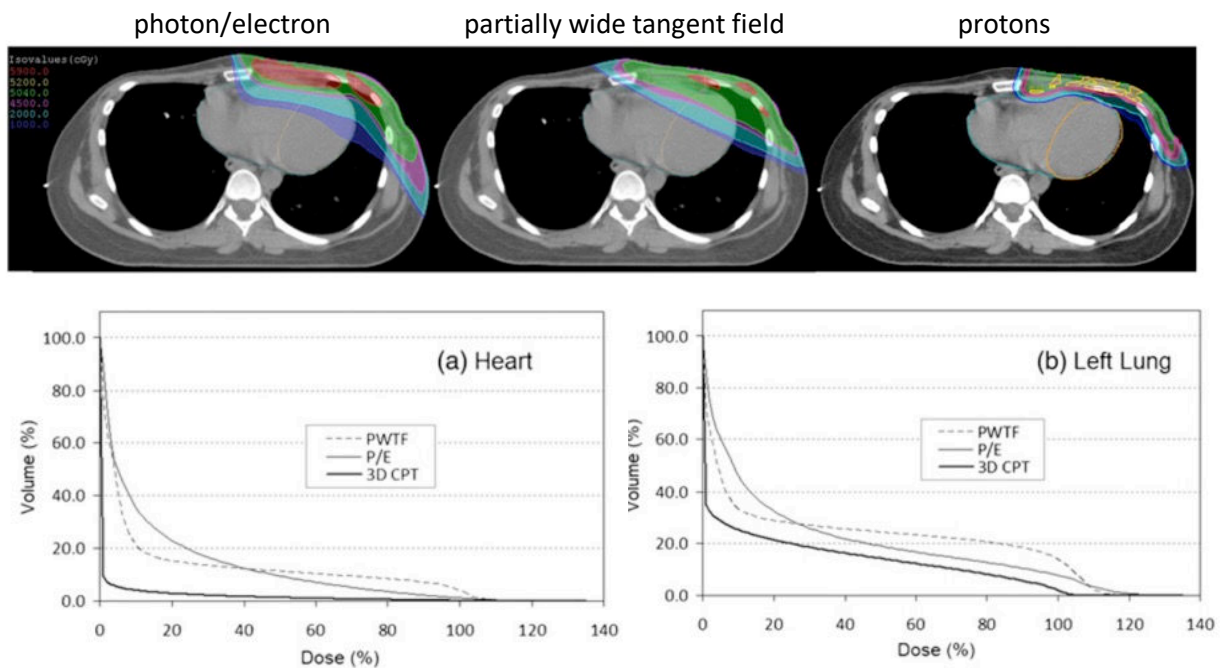


Figure 34. Pourcentage de dose reçue chez des patientes dans le cœur et le poumon gauche de patientes traitées pour un cancer du sein gauche par PT. P/WTF : Partially Wide Tangent Fields, P/E : Photon/Electron, 3D CPT : three-dimensional conformal proton therapy. D'après (MacDonald et al. 2013)

La technique active (PBS) permet une meilleure conformation de la dose à la tumeur (Figure 35).

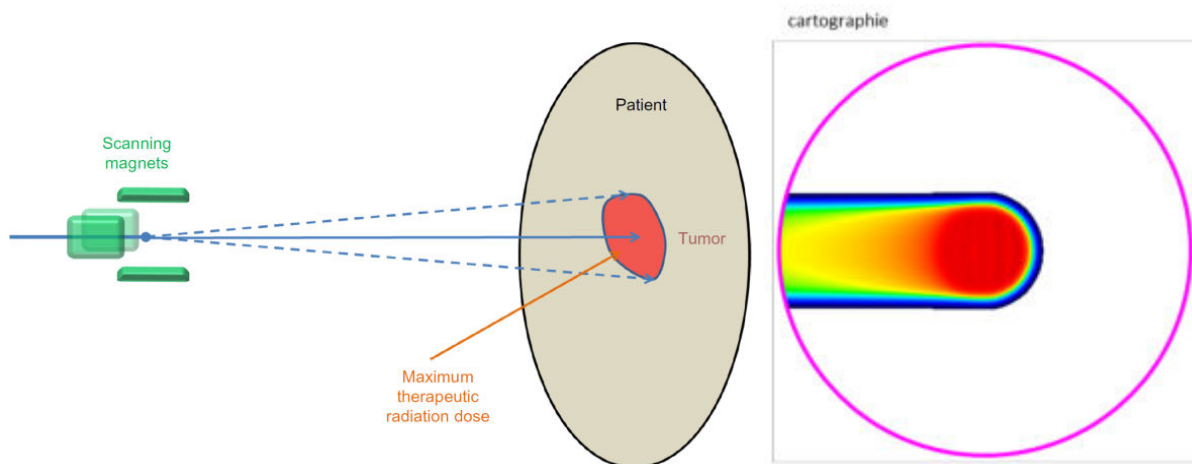


Figure 35. Illustration de la dose déposée (rouge) dans le cas de la technique active (PBS) de traitement par PT. D'après (Wang 2015)) et Jean-Marc Fontbonne (LPC-Caen).

Cependant, cette technique conduit sur les tissus sains et tumoraux à des grandes disparités dans : (i) le débit de dose (jusqu'à plusieurs dizaines de Gy/s au niveau de la couche distale de

la tumeur), (ii) la durée (quelques secondes dans la zone distale à plusieurs minutes dans la zone proximale) et (iii) le nombre de fractions pour chaque position dans le volume traité (dose délivrée en une fois dans la partie la plus distale *versus* en un grand nombre de fois dans la partie la plus proximale) (De Marzi 2016).

Ceci peut donc aboutir à des différences de réponses biologiques dans les OAR localisés à proximité de la tumeur. Après PT, les incertitudes liées aux réponses biologiques sont estimées à 5 à 10%, l'EBR des protons étant considéré égale à 1,1 (Paganetti 2002; 2014).

Enfin, les lignes de faisceaux existantes sont généralement dédiées à la recherche en physique et leur accès est compliqué. De plus, elles sont inadaptées aux expériences de radiobiologie. Ainsi, les données de radiobiologie concernant l'hadronthérapie sont en quantité limitée et les techniques employées ne sont globalement pas homogènes (pour revue, (Tommasino et Durante 2015)). A l'échelle nationale, il n'existe aucune équipe dont la thématique de recherche principale est la protonthérapie. Très peu d'études ont donc été conduites dans ce domaine et encore moins sur les cellules et tissus sains.

La majorité des travaux menés sur la PT portent sur les cellules tumorales de rongeurs et, en plus petite quantité, sur les cellules tumorales humaines. Concernant les cellules humaines saines, le nombre de travaux est encore plus limité. Les effets de la PT *in vivo* sont aussi peu abondamment décrits dans la littérature comparativement à ceux portant sur la radiothérapie conventionnelle. La plupart du temps, ces études portent sur la croissance ou encore l'invasion et la migration tumorale.

En ce qui concerne les travaux menés sur les tissus sains, ils se sont focalisés sur les phénomènes inflammatoires. La discordance entre les résultats obtenus à l'heure actuelle a rendu les résultats peu concluants (Girdhani et al. 2012; Rithidech et al. 2010).

Par ailleurs, la seule étude comparative rayons X *vs.* protons disponible concernant la fibrose pulmonaire chez le rat est rédigée en japonais et date de 1990 (Murayama 1990). Cette dernière montre une différence de réponse entre les deux modalités d'irradiation avec une réponse plus tardive et moins importante concernant la fibrose pulmonaire radio-induite après exposition aux protons en comparaison des rayons X.

Dans la littérature, les études publiées concernant le stress oxydatif après PT tendent à montrer le rôle de celui-ci dans la réponse aux protons. Ainsi, une augmentation d'ERO plus rapide après irradiation aux protons par rapport aux photons a été observée dans des cellules souches neurales de rat (Giedzinski et al. 2005). Wan *et al.* ont montré que l'irradiation par protons ou rayons X de cellules épithéliales induisait une production similaire d'ERO (Wan et al. 2006). De plus, Gridley *et al.* ont montré sur des souris irradiées TBI l'existence d'une modification

de l'expression des gènes impliqués dans la réponse antioxydante de manière identique que ce soit après irradiation aux rayons X ou en protons, toutefois l'augmentation de l'expression de Prdx6 et Sod3 ne concernait que l'irradiation en protons (Gridley et al. 2011). Dans le même sens, une augmentation tardive de la production d'ERO, de la transcription de NOX4 et des dommages à l'ADN dans les cellules souches hématopoïétiques a été constatée après une irradiation corps entier de souris C57Bl6 par protons (Chang et al. 2015). Mao *et al.* ont observé une augmentation de l'expression des gènes de l'apoptose et de la réponse au stress oxydant à l'issue de l'irradiation de l'œil du rat par protons (Mao et al. 2010). L'expression de gènes de la réponse au stress oxydant menant à la mort cellulaire programmée a été modifiée au niveau cérébral chez la souris après une irradiation aux protons (Baluchamy et al. 2010). Des effets radioprotecteurs ont été démontré *in vivo* (Wan et al. 2006) et *in vitro* (Guan et al. 2006) par le biais d'utilisation d'anti-oxydants après l'irradiation en protons. Un effet radioprotecteur a également été constaté au niveau des lésions cérébrales après irradiation aux protons à faible dose, ceci a été démontré par Chmielewski *et al.* sur des souris transgénique surexprimant la catalase mitochondriale humaine (Chmielewski et al. 2016). De la même manière, Lia *et al.* ont démontré, chez les souris irradiées par des protons, que la réduction des ERO mitochondriales a un effet neuroprotecteur (Liao et al. 2013). Ces différentes études nous permettent de constater que le stress oxydatif semble bien jouer un rôle prépondérant dans l'apparition des toxicités de la PT.

Concernant les lésions de l'ADN dans les cellules saines, le nombre de CDB semblent peu différenciés après exposition aux protons en comparaison des photons. En revanche, leur complexité semble plus importante et, de fait, le nombre de cassures résiduelles semble plus élevé (Moertel, 2004). De la même manière, le nombre de micronoyaux est aussi augmenté *in vivo* dans des rats (Green et al. 2001), dans un modèle de peau humaine (EBR = 1.1) (Schmid et al. 2009), et *in vitro* dans des fibroblastes humains (Antoccia et al. 2009) après irradiation par des protons *versus* photons. En revanche, dans des lymphocytes humains, Joksic *et al.* (Joksic et al. 2000) ont montré une diminution de la formation de micronoyaux après protons *versus* photons. La longueur des télomères est étonnamment augmentée après protons *versus* photons dans des fibroblastes normaux alors que le pourcentage de fragments acentriques diminue semblant indiquer que les protons seraient plus enclins à induire une instabilité génomique tardive (Berardinelli et al. 2011).

Concernant la mort cellulaire, l'apoptose est clairement augmentée dans les cellules normales après exposition aux protons *versus* photons (Antoccia et al. 2009; Green et al. 2001) avec une entrée plus rapide en apoptose probablement à cause des lésions spécifiques engendrées par les

protons. En revanche, Radojic et Crompton (Radojic et Crompton 2001) ne présentent, dans leur étude, aucune différence de niveau d'apoptose dans des lymphocytes exposés à des protons ou des photons.

Concernant les observations des effets des protons sur les tissus sains faites *in vivo* sur des modèles précliniques, elles sont en accord avec l'EBR généralement utilisée pour les protons, c'est-à-dire 1,1. Ainsi, que ce soit les toxicités cutanées, oculaires, rectales, hématologiques, cardiovasculaires, le poids des organes, la perte de poids des animaux, la mortalité, l'induction de tumeurs (Kajioka et al. 2000; Gueulette et al. 2000; Nemoto et al. 1998; Tatsuzaki et al. 1991; 1987; Satoh et al. 1986; Urano et al. 1984; Tepper et al. 1977; Raju et Carpenter 1978; Constable et al. 1976; Clapp, Darden, et Jernigan 1974; Darden et al. 1970; Montour, Straub, et Shellabarger 1969; Sténson 1969b; 1969a; Jesseph et al. 1968; Ashikawa et al. 1967; Taketa et al. 1967; Zellmer, Culver, et Pickering 1967; Dalrymple, Lindsay, Ghidoni, Hall, et al. 1966; Dalrymple, Lindsay, Ghidoni, Kundel, et al. 1966; Dalrymple, Lindsay, Ghidoni, Mitchell, et al. 1966; Dalrymple, Lindsay, Hall, et al. 1966; Kundel 1966; Baarli et Bonet Maury 1965; Bradley et al. 1964; Falkmer, Larsson, et Stenson 1959; Warshaw et Oldfield 1957; Tobias, Anger, et Lawrence 1952), les EBR étaient comprises entre 1,1 et 1,3, excepté concernant une étude de toxicité oculaire chez le lapin où l'EBR était plus élevée (entre 2 et 2,6) (Cleary et al. 1972; 1973). Deux études de Tatsuzaki *et al.* (Tatsuzaki et al. 1991; 1987) ont montré une EBR plus faible des protons *versus* photons (0,8-0,9) pour induire des toxicités cutanées. Très récemment, les travaux menés par Choi *et al.* ont montré une plus forte toxicité au niveau gastrointestinal des protons *versus* photons dans des modèles murins (Choi et al. 2019).

Il apparaît donc que les travaux menés jusqu'à l'heure actuelle ne permettent pas de répondre aux nombreuses questions posées concernant l'exposition des tissus sains à des faisceaux de protons comparativement aux photons. Les questions en suspens concernent notamment les phénomènes oxydatifs et les possibilités endogènes de détoxification cellulaire, les types de lésions de l'ADN produites et leur réparation, les signatures moléculaires spécifiques (morts cellulaires, blocage du cycle, voies de signalisation...), la régulation - modulation spécifique de certains gènes par les protons, la communication inter-cellulaire (cellules épithéliales, endothéliales et fibroblastes tumoraux), la régulation-modulation des composants de la matrice extra-cellulaire des tissus sains, le rôle du microenvironnement tumoral et l'angiogénèse, le rôle du fractionnement, l'effet « bystander », la cancérogenèse radio-induite aux doses thérapeutiques et infra-thérapeutiques...

4. Les biomarqueurs d'effets secondaires et de radiosensibilité

En général, on considère que 5 à 10% de la population générale présentent des réactions aiguës ou tardives sévères après traitement par RT. Différents biomarqueurs ont été proposés et ont été étudiés afin d'évaluer les effets secondaires de la RT, mais aussi afin de les prédire (Figure 36).

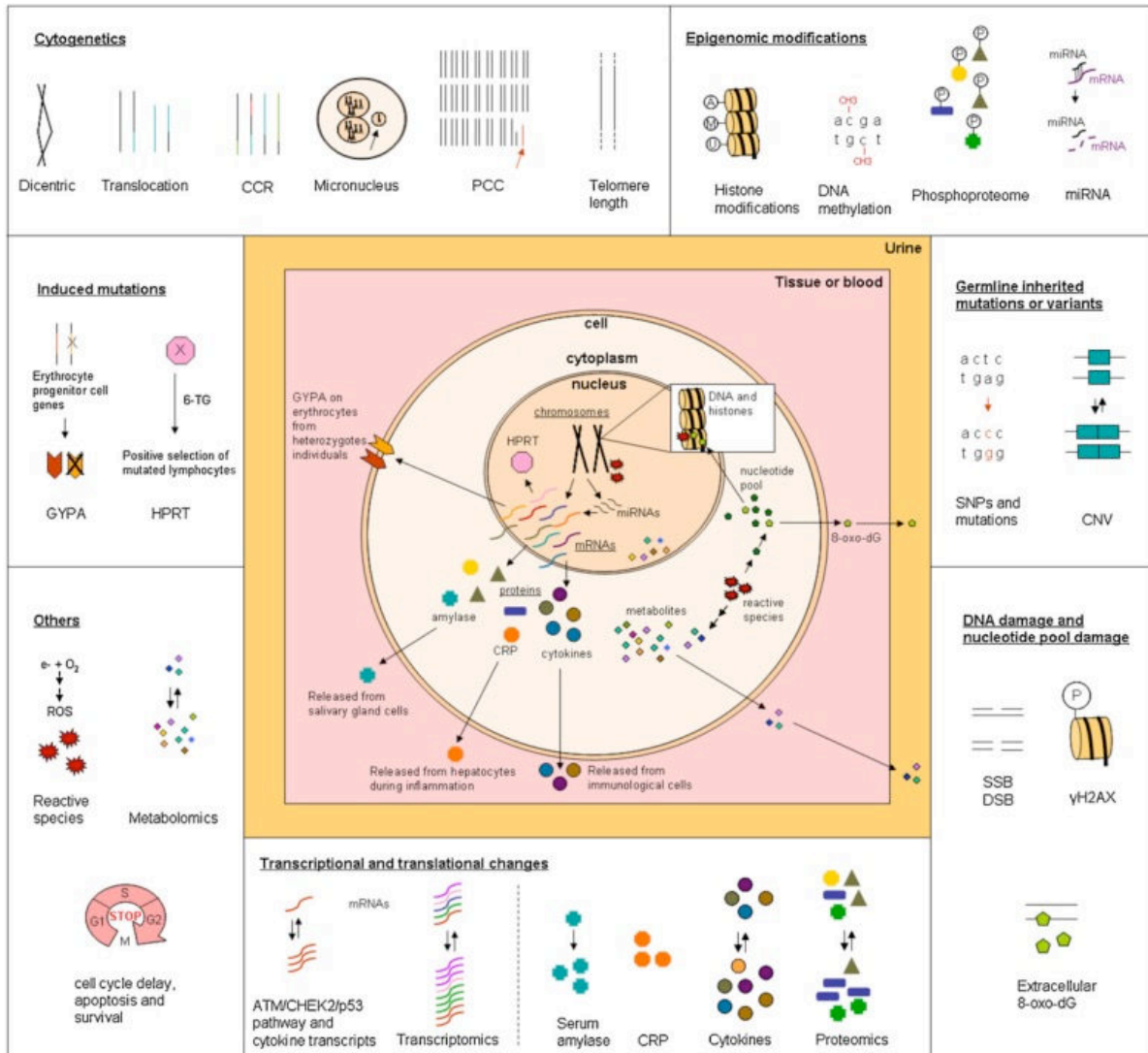


Figure 36. Schéma représentant les différents biomarqueurs étudiés après RT. D'après (Pernot et al. 2012)

Dans la littérature, des études se sont en effet déjà intéressées à de nombreux biomarqueurs après irradiation (pour revue, (Pernot et al. 2012). Les marqueurs cytogénétiques tels que les chromosomes dicentriques (IAEA 2019), les translocations (Tucker 2008; Tucker et Luckinbill 2011), les réarrangements chromosomiques complexes (Hada, Wu, et Cucinotta 2011; Sabatier et al. 1987; M'kacher et al. 2007; Buckton et al. 1978), la PCC (Premature Chromosome Condensation) (Lamadrid et al. 2007; Ainsbury et al. 2011; Lindholm et al. 2010), la longueur des télomères (M'kacher et al. 2007; Berardinelli et al. 2011; Baerlocher et al. 2006), et les

micronoyaux (El-Zein, Vral, et Etzel 2011; Vral, Fenech, et Thierens 2011) ont montré leur efficacité en tant que biomarqueurs d'effets tardifs. De même, les CSB et CDB (Bergqvist et al. 1998), les foci γ -H2AX (Goodarzi et Jeggo 2012) et la 8-oxodG (Sangsuwan et Haghdoost 2008; Haghdoost et al. 2001; Haghdoost, Maruyama, et al. 2006) font aussi partie des biomarqueurs d'intérêt après RT. Le niveau de protéines ou de molécules impliquées dans des phénomènes inflammatoires (CRP, interleukines...) ou oxydatifs (4-HNE, 8-oxodG) a aussi été utilisé pour évaluer les effets de la RT. Plus récemment, la protéomique, mais aussi des biomarqueurs de mutations (SNP : Single Nucleotide Polymorphism, CNV : Copy Number Variants et CNA : Copy Number Alterations), de modifications transcriptionnelles (voies ATM/CHK2/P53) et épigénétiques (méthylation de l'ADN, modifications des histones, miRNA) ont été étudiés (pour revue, (Pernot et al. 2012)

En ce qui concerne les biomarqueurs de prédiction, les études se sont principalement orientées vers la possibilité de prédiction de l'apparition des effets secondaires cutanés par la mesure de marqueurs de stress oxydatif ou d'inflammation (Lacombe et al. 2013). Ces études sont axées pour la plupart sur la mesure des marqueurs de stress oxydatif ou d'inflammation dans le sang ou, plus rarement, dans les urines ou dans les fibroblastes de derme.

Dans des fibroblastes de derme provenant de biopsies de peau de patients, quelques travaux ont été entrepris et restent à confirmer. Concernant les lésions de l'ADN, Oppitz *et al.* (Oppitz et al. 1999) ont montré une diminution de la vitesse de réparation de l'ADN par la technique des comètes chez les patients présentant des effets aigus et tardifs après RT ; dans la même équipe, Nachtrab *et al.* (Nachtrab et al. 1998) ont montré que la fréquence de micronoyaux était plus élevée chez les patients sensibles aux effets secondaires. Concernant les cytokines inflammatoires, Quarmby *et al.* (Quarmby et al. 2002) ont mesuré l'expression de cytokines au moyen de microarrays ce qui leur a permis de distinguer les patients présentant ou non des effets secondaires. Burnet *et al.* (Burnet et al. 1992) ont montré une forte corrélation entre la survie des fibroblastes *in vitro* et les effets secondaires cutanés, surtout en ce qui concerne les effets aigus. Concernant le profil d'expression des gènes, l'équipe de Alsner (Rødningen et al. 2008; Andreassen, Overgaard, et Alsner 2013) a découvert que 9 gènes, dont SOD2 et SOD3, pourraient permettre de différencier les patients à haut ou à bas risque de développement d'effets secondaires cutanés.

Dans les urines, les mesures de marqueurs d'inflammation et d'oxydation restent limitées. Une étude a montré que le niveau de 8-OHdG extracellulaire était plus bas pour les patients présentant des effets secondaires cutanés majeurs comparé à ceux présentant des effets mineurs (Haghdoost et al. 2001).

Les prélèvements sanguins sont plus aisés à obtenir que des biopsies de peau dans le cadre de la mise en place d'une technique prédictive à plus grande échelle sur des patients devant subir une RT. Par ailleurs, une corrélation existe entre les lésions observées dans le sang et celles mesurées dans des biopsies de peau (Núñez et al. 1998). Les marqueurs prédictifs étudiés au niveau cutané jusqu'à présent dans le sang sont :

- la 8-OHdG extracellulaire (Skiöld et al. 2015) : une augmentation du niveau de 8-oxo-dG dans le sérum de sang irradié *ex vivo* a été observée dans des patients ne présentant pas d'effets secondaires cutanés (grade 0) alors qu'aucune augmentation n'était mesurée chez les patients présentant des grades 3 ou 4 ;
- la CRP (Rodriguez-Gil et al. 2014): cette étude récente a montré que les patients présentant des effets cutanés supérieurs à un grade 2 avaient un taux de CRP élevé ;
- les lésions de l'ADN étudiées par le test des comètes (Popanda et al. 2003) ou par les micronoyaux (Barber et al. 2000): les résultats de ces études n'ont pas permis de discriminer de manière significative des patients présentant ou non des effets secondaires cutanés. Toutefois, *Goutham et al.* ont montré qu'il y a une corrélation entre les CDB identifiés dans le sang et le grade de toxicité observé chez les patients (Goutham et al. 2012).
- l'expression du gène CDKN1A : *Badie et al.* ont montré que l'expression de ce gène dans les lymphocytes des patientes traitées pour un cancer du sein était réduite en cas de toxicité cutanée aiguë (Badie et al. 2008).

La plupart des autres études sur la prédiction de l'apparition des effets secondaires après la RT concerne les effets secondaires pulmonaires suite à un traitement par RT du cancer du poumon (Giridhar et al. 2015; Rube et al. 2008). Si l'on élimine les marqueurs spécifiques au poumon, les marqueurs restants testés pour leur valeur prédictive sont :

- les cytokines : les travaux de *Anscher et al.* (Anscher et al. 1998) et de *Zhao et al.* (Zhao et al. 2008) ont montré que les niveaux de TGF- β 1 dans le sérum du sang de patients ne développant pas d'effets secondaires pulmonaires étaient normaux tandis que ces

niveaux étaient plus élevés après traitement chez les patients à plus haut risque de lésions pulmonaires induites par la RT ; un niveau élevé de l'IL-1 α et de l'IL-6 plasmatiques a été utilisée comme outil prédictif d'une pneumopathie radique (Chen et al. 2005); un niveau bas d'IL-8 plasmatique avant RT était corrélé à une toxicité pulmonaire radio-induite (Stenmark et al. 2012); et enfin, un niveau élevé d'ICAM-1 dans le sérum a été mesuré dans les patients développant une pneumopathie radique (Tsujisaki et al. 1991);

- les activités des enzymes antioxydantes : les patients développant une pneumopathie radique montraient une activité SOD plus élevée et une activité GPx plus basse dans les érythrocytes en comparaison des patients sans effets secondaires (Park et al. 2007);
- le polymorphisme de 2 gènes : le polymorphisme d'ATM a été mesuré dans les leucocytes de patients et les résultats ont permis de l'associer à un risque accru de pneumopathie radique (Xiong et al. 2013); le polymorphisme du TGF- β 1 n'a pas pu être associé à une augmentation des risques d'effets secondaires pulmonaires (Barnett et al. 2012; Voets et al. 2012);
- l'analyse protéomique du plasma : Cai *et al.* (Cai et al. 2011; 2010) ont montré que certaines protéines étaient surexprimées chez les patients qui ont présenté une toxicité pulmonaire élevée ; et Oh *et al.* (Oh et al. 2011) par une nouvelle méthode d'analyse, ont mis en évidence que l' α -2-macroglobuline pouvait permettre de dissocier significativement les patients présentant ou non des effets secondaires pulmonaires.

Si l'on s'intéresse aux effets secondaires de la RT d'un point de vue plus global et sur d'autres localisations, la mesure du taux d'apoptose dans les lymphocytes s'est révélée une piste fructueuse. En effet, les travaux menés ont montré qu'un taux d'apoptose lymphocytaire bas après irradiation de sang *ex vivo* était prédictif d'effets secondaires (cutanés, pulmonaires et cardiaques) supérieurs à grade 2 (Ozsahin 2005; Schnarr et al. 2009; Bordón et al. 2009) atteignant un taux de réussite de prédiction de 91% (Azria et al. 2015). Cependant, un pourcentage de patients échappe à cette règle et ne présente pas d'effets secondaires. Toujours d'un point de vue global, la mesure des CDB de l'ADN par γ -H2AX dans les lymphocytes a montré une corrélation entre les effets secondaires de la RT en général et une capacité de réparation de l'ADN diminuée (Bourton et al. 2011; Pouliliou et al. 2015). La longueur des télomères, qui sont plus sensibles que le reste du génome aux RI, pourrait également constituer une piste intéressante mais reste encore à investiguer plus amplement (Mirjolet et al. 2015). L'analyse par microarray a également été utilisée avec plus ou moins de succès : la réponse

transcriptionnelle de 24 gènes a permis de prédire la toxicité (cutanée, pulmonaire, cérébrale...) pour 9 patients sur les 14 étudiés (Rieger et al. 2004) et une autre étude a permis la prédiction de toxicités tardives pour 21 patients sur les 39 étudiés (Svensson et al. 2006). Actuellement, des approches génomiques (polymorphisme d'un seul nucléotide SNP, études d'association du génome entier GWAS, criblage à haut débit) et protéomiques sont en plein développement sachant que la variabilité des types cellulaires, des localisations, des patients, des protocoles de RT et des protocoles d'étude reste un facteur limitant (Lacombe et al. 2013).

OBJECTIFS DE LA THESE

L'origine des effets secondaires de la RT et les phénomènes induits par l'irradiation sur les tissus sains ne sont pas encore tout à fait élucidés. En effet, peu d'études ont porté sur les effets secondaires des différents traitements par RT sur les tissus sains, surtout en ce qui concerne l'hadronthérapie. Dans ce contexte, ce projet de thèse vise à étudier des biomarqueurs d'intérêt en radiobiologie (stress oxydant, génotoxicité, apoptose, inflammation, transcriptomique) et a été décomposé en 2 parties : une étude clinique portant sur la radiosensibilité des patients en RT conventionnelle et une étude préclinique sur un modèle murin exposé à différents modes de protonthérapie.

L'objectif de l'étude clinique est la recherche de biomarqueurs sanguins de radiosensibilité en vue d'une éventuelle prédiction, à terme, de l'apparition d'effets secondaires cutanés tardifs après traitement par radiothérapie conventionnelle chez des patients traités pour un carcinome de Merkel. Pour cela, il nous faudrait trouver un ou un groupe de biomarqueurs sanguins spécifiques d'une toxicité tardive au niveau cutané qui peut se révéler délétère sur le plan fonctionnel et constituer une séquelle définitive au traitement. Dans ce but, une irradiation *ex vivo* du sang de patients présentant différents grades de toxicité cutanée tardive a été effectuée à deux doses, 2 et 10 Gy, contre un témoin non-irradié. Des biomarqueurs d'intérêt (génotoxicité, apoptose, stress oxydatif et inflammation) ont été mesurés sur ces échantillons sanguins provenant de patients (**ARTICLE N°1**). Les questions posées sont :

- Y a-t-il des différences de réponse à long terme en ce qui concerne les biomarqueurs étudiés entre les patients présentant pas ou peu de toxicité et ceux présentant une forte toxicité cutanée tardive ?
- Peut-on mettre en évidence un ou un groupe de biomarqueurs sanguins dont les variations après irradiation *ex vivo* permettraient de discriminer au sein d'une population traitée par RT les individus dits radiosensibles, présentant d'importantes séquelles cutanées, du reste de la population ?

Pour épargner les tissus sains qui représentent le principal facteur limitant des traitements par RT, des améliorations ont été apportées via l'imagerie, la biomodulation et la balistique. Les traitements par les hadrons représentent une rupture technologique permettant de mieux cibler les tumeurs et ainsi d'éviter d'atteindre les organes à risque (OAR) situés à proximité. La création à Caen d'un centre de ressources en hadronthérapie, ARCHADE (Advanced Resource Centre for HADrontherapy in Europe), a pour but la fabrication d'un prototype permettant de traiter les patients par différents hadrons, tels que les protons et les ions carbone. La première étape a été la mise en place de traitements par protonthérapie en Juillet 2018 via l'achat d'un

synchrocyclotron supraconducteur S2C2 (IBA). La deuxième partie de ce travail vise à évaluer la toxicité de ces nouveaux traitements sur les tissus sains. L'étude clinique est ici difficilement envisageable dans un premier temps du fait du faible nombre de patients traités et de l'hétérogénéité de leurs profils (localisations tumorales, volume irradié, âge...). Nous avons donc opté pour un modèle préclinique : des souris C57Bl6 (souche capable de développer des effets secondaires après irradiation). L'utilisation de modèles murins permet (i) une étude plus large : sang, mais aussi cœur, poumons, peau, et (ii) la comparaison des différents modes de délivrance des faisceaux de protons (diffusés ou balayés) ce qui serait très difficilement concevable en clinique.

Dans ce but, les animaux ont été exposés corps entier à un faisceau diffusé (DS, Double Scattering) ou à un faisceau balayé de protons (PBS, Pencil Beam Scanning) et la réponse des tissus sains après irradiation a été observée (**ARTICLES N°2 et N°3**). Cette observation a été réalisée par le biais du suivi de biomarqueurs dans le sang et dans les organes prélevés 3 mois après l'irradiation. Cette étude doit nous permettre de répondre à plusieurs questions :

- Existe-t-il encore à long terme après l'irradiation une différence entre les souris irradiées ou non-irradiées en terme de stress oxydatif, de génotoxicité, d'inflammation et de transcriptomique dans les tissus sains ? Si oui, quels sont les biomarqueurs les plus pertinents et, donc, les voies à étudier en priorité ?
- Existe-t-il une différence de réponse à l'irradiation des tissus sains entre les 2 types de délivrance des faisceaux de protons : PBS et DS ? Si oui, quels sont les biomarqueurs dont les mesures diffèrent et quelles sont les voies à étudier ?

A terme, les objectifs seraient : (i) de mettre en place une étude prospective de validation de nos biomarqueurs sanguins après RT conventionnelle, (ii) d'élargir l'application aux populations traitées pour un cancer du sein ou un cancer ORL, (iii) de transposer notre travail *a minima* sur du sang, voire sur des biopsies d'organes, de patients exposés aux faisceaux de protons d'ARCHADE, (iv) de proposer des stratégies afin de prévenir et/ou de traiter les effets secondaires de l'irradiation sur les tissus sains mais aussi afin d'améliorer les traitements (traitements combinés) et enfin (v) d'approfondir l'étude des voies mises en avant par la transcriptomique.

Ces études sont menées en collaboration avec le CLCC François Baclesse (Radiothérapie et Physique Médicale), l'Institut Curie-Centre de Protonthérapie (Physique Médicale, Plateforme RadeXp) et -Centre de Recherche (INSERM U1196/UMR9187, le CHU de Caen (Dermatologie) et la plateforme ABiMS (FR 2424 CNRS UPMC).

RESULTATS

Article 1: The Possibility of Using Genotoxicity, Oxidative stress and Inflammation blood Biomarkers to predict the Occurrence of Late Cutaneous Side Effects after Radiotherapy

Malgré les améliorations des traitements par radiothérapie (RT) tant du point de vue des protocoles d'irradiation que des technologies utilisées, il existe toujours une toxicité de ce traitement aux tissus et organes sains. On distingue les toxicités aiguës des toxicités tardives. La toxicité aiguë, apparaissant dans les semaines suivant le traitement, est souvent associée aux réponses inflammatoires après irradiation et n'est pas toujours limitée au champ d'irradiation. La toxicité tardive apparaît dans les mois voire les années après irradiation et est généralement limitée au volume de tissu traité. Pour éviter cette toxicité du traitement par RT, et donc pour améliorer le ratio thérapeutique (mort des cellules tumorales/toxicité aux tissus sains), nous proposons d'essayer de prédire l'apparition des effets tardifs au niveau cutané par la mesure de marqueurs de stress oxydatif et d'inflammation dans le sang irradié *ex vivo* (Figure 37) de

patients ayant présenté ou non des effets secondaires cutanés suite à un traitement par RT. Pour cette étude clinique PAESCART (Prédiction de l'Apparition des Effets Secondaires Cutanés tardifs Après RadioThérapie), le recrutement a été limité à une seule localisation tumorale ainsi qu'à un nombre de 18 patients. La localisation sélectionnée, les carcinomes de Merkel, répond à 3 critères essentiels : une irradiation sur une surface étendue de peau, une dosimétrie fine et pas de chimiothérapie associée. Deux groupes de 9 patients traités par radiothérapie au CLCC Baclesse pour un carcinome de Merkel ont été constitués suivant la



Figure 37. Irradiation ex vivo du sang des patients par l'accélérateur linéaire Artiste (Siemens) à 6 MV.

classification RTOG/EORTC : le groupe $Tox \leq 2$ présentant pas ou peu de toxicité tardive (grades 0, 1 et 2) et le groupe $Tox \geq 3$ présentant une toxicité sévère (grades 3 et 4). Delphine

Dumont Lecomte, interne en radiothérapie en stage de Master 2 au laboratoire, a permis la mise en place de cette étude clinique avec, notamment, le dépôt du dossier de CPP (comité de protection des personnes), le recrutement des patients et leur consultation de suivi (évaluation du grade de toxicité tardive conjointement avec un radiothérapeute sénior du laboratoire : Dinu Stefan) et l'organisation des prélèvements sanguins.

L'objectif principal est de pouvoir discriminer les 2 types de patients par la quantification de biomarqueurs d'intérêt en radiobiologie appliquée à la radiothérapie : cycle cellulaire, apoptose, génotoxicité, stress oxydatif et inflammation. Le cycle cellulaire a été étudié par la technique de cytométrie en flux avec l'étude en particulier de la phase sub-G1, l'apoptose lymphocytaire ayant déjà montré son intérêt dans l'évaluation de la radiosensibilité chez les patients (Azria et al. 2015). La génotoxicité a été évaluée par la quantification des micronoyaux lymphocytaires selon la technique CBMN (Cytokinesis Blocked MicroNucleus assay) couplée à une analyse d'images automatisée via le logiciel Metafer (MetaSystems). Le dosage des enzymes antioxydantes dans les lysats érythrocytaires a été réalisé par des méthodes biochimiques soit en utilisant des kits commerciaux (comme pour la SOD) quand cela était correct et afin de standardiser au maximum les mesures en vue d'une mise en place à plus grande échelle, soit par la réalisation de cinétiques enzymatiques suivant le protocole de Clairborne et Aebi pour l'activité catalase ou le protocole de Sinet pour la GPx. Le ratio glutathion réduit/glutathion oxydé, la carbonylation des protéines et la peroxydation lipidique dans les lysats érythrocytaires ont été évalués par des kits commerciaux. Un panel de 13 cytokines pro- et antiinflammatoires a été mesuré dans le plasma au moyen d'un kit : différentes billes fluorescentes recouvertes d'anticorps spécifiques aux cytokines sont mises en présence des échantillons puis d'un anticorps biotinylé et enfin de streptavidine-phycoérythrine, la phycoérythrine est excitée et émet un signal détecté par cytométrie en flux (CYTOFLEX). Concernant la mesure du TGF- β 1 plasmatique, une technique assez similaire a été utilisée mais avec l'utilisation de billes magnétiques permettant à l'appareil LUMINEX (MAGPIX) d'aimanter ces billes en une monocouche pendant que deux LEDs distinctes les illuminent : l'une identifie l'analyte et l'autre quantifie le signal PE, et une caméra CCD prend une image du puits.

L'ensemble des résultats a été rapporté à la quantité de protéines présentes dans chaque échantillon dosé préalablement selon la méthode de Bradford.

Cette étude, menée en collaboration avec les services de radiothérapie, physique médicale et recherche clinique du CLCC Baclesse, nous a permis de montrer que les patients les plus radiosensibles présentent au niveau lymphocytaire : une diminution de l'apoptose et de la fréquence des micronoyaux ; au niveau érythrocytaire : une diminution des activités

enzymatiques antioxydantes, du glutathion et des carbonyles ; au niveau plasmatique : une augmentation des niveaux de TNF- α , d'IL-8 et de TGF- β 1. Ces résultats doivent être confirmés sur un plus grand nombre de patients par une étude prospective et pourraient permettre de prédire la survenue d'effets secondaires cutanés tardifs après radiothérapie. L'objectif serait également d'observer ces mêmes biomarqueurs chez des patients traités par protonthérapie présentant ou non des toxicités tardives.



Article

The Possibility of Using Genotoxicity, Oxidative Stress and Inflammation Blood Biomarkers to Predict the Occurrence of Late Cutaneous Side Effects after Radiotherapy

Samia Chaouni ^{1,†}, Delphine Dumont Lecomte ^{1,2,†}, Dinu Stefan ^{1,3}, Alexandre Leduc ¹, Victor Barraux ⁴, Alexandra Leconte ⁵, Jean-Michel Grellard ⁵, Jean-Louis Habrand ^{1,3}, Marilyne Guillamin ⁶, François Sichel ^{1,7} and Carine Laurent ^{1,8,*}

¹ ABTE-EA4651, ToxEMAC, Normandie University, UNICAEN, UNIROUEN, 14000 Caen, France, samia.chaouni@unicaen.fr (S.C.); lecomte.del@gmail.com (D.D.L.); d.stefan@baclesse.unicancer.fr (D.S.); alexandre.leduc@unicaen.fr (A.L.); jl.habrand@baclesse.unicancer.fr (J.-L.H.); francois.sichel@unicaen.fr (F.S.)

² Radiotherapy Department, Hôpital Haut-Lévêque, CHU de Bordeaux, 33600 Pessac, France

³ Radiotherapy Department, Cancer Centre François Baclesse, 14000 Caen France

⁴ Medical Physics Department, Cancer Centre François Baclesse, 14000 Caen, France, BARRV@baclesse.unicancer.fr

⁵ Clinical Research Department, Cancer Centre François Baclesse, 14000 Caen, France, A.LECONTE@baclesse.unicancer.fr (A.L.); JM.GRELLARD@baclesse.unicancer.fr (J.-M.G.)

⁶ IFR ICORE-Flow Cytometry Platform, Normandie University, UNICAEN, 14000 Caen, France, m.guillamin@baclesse.unicancer.fr

⁷ Cancer Centre François Baclesse, 14000 Caen, France

⁸ SAPHYN/ARCHADE (Advanced Resource Centre for HADrontherapy in Europe), Cancer Centre François Baclesse, 14000 Caen, France

[†] These authors contributed equally to this work

* Correspondence: carine.laurent@unicaen.fr

Received: 10 February 2020; Accepted: 6 March 2020; Published: 7 March 2020

Abstract: Despite the progresses performed in the field of radiotherapy, toxicity to the healthy tissues remains a major limiting factor. The aim of this work was to highlight blood biomarkers whose variations could predict the occurrence of late cutaneous side effects. Two groups of nine patients treated for Merkel Cell Carcinoma (MCC) were established according to the grade of late skin toxicity after adjuvant irradiation for MCC: grade 0, 1 or 2 and grade 3 or 4 of RTOG (Radiation Therapy Oncology Group)/EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer). To try to discriminate these 2 groups, biomarkers of interest were measured on the different blood compartments after ex vivo irradiation. In lymphocytes, cell cycle, apoptosis and genotoxicity were studied. Oxidative stress was evaluated by the determination of the erythrocyte antioxidant capacity (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, reduced and oxidized glutathione) as well as degradation products (protein carbonylation, lipid peroxidation). Inflammation was assessed in the plasma by the measurement of 14 cytokines. The most radiosensitive patients presented a decrease in apoptosis, micronucleus frequency, antioxidant enzyme activities, glutathione and carbonyls; and an increase in TNF- α (Tumor Necrosis Factor α), IL-8 (Interleukin 8) and TGF- β 1 (Transforming Growth Factor β 1) levels. These findings have to be confirmed on a higher number of patients and before radiotherapy and could allow to predict the occurrence of late skin side effects after radiotherapy.

Keywords: radiotherapy; toxicity; skin; prediction; genotoxicity; oxidative stress; inflammation; biomarkers

1. Introduction

Radiotherapy (RT) remains, with chemotherapy, the cornerstone of cancer treatment. This treatment concerns about 50% of cancer patients, during their cure whether in a curative, adjuvant or palliative situation [1]. Many technical advances have been made to improve treatments, particularly in terms of ballistics (intensity-modulated RT, stereotaxis, hadrontherapy) in order to deliver more precisely the dose to the target zone, while preserving the surrounding healthy tissues [2,3].

In terms of radiation toxicity, we can distinguish early events occurring during or shortly after treatment from late events which take place in a period of more than 6 months to several years after irradiation [4]. Skin is an organ of choice for the study of these toxicities since it is always crossed by radiations during a RT treatment and is constituted of fast proliferating cells and therefore may be representative of other fast-renewal tissues like intestine. The effects of ionizing radiations on skin are complex because of the great diversity of the cell types involved (keratinocytes, fibroblasts, endothelial cells, etc.). The intensity of skin reaction to ionizing radiations is very variable from one individual to another depending on intrinsic radiosensitivity related to kinetics of cell renewal, proliferation rate, hypoxia etc. [5–7]. Radiation exposure induces skin side effects like pigmentation, cutaneous atrophy, telangiectasia, subcutaneous fibrosis or necrosis [4]. This can constitute definitive sequelae of the treatment leading to pain and can also lead potentially to malignant transformation.

Skin side effects after RT are often associated to oxidative stress (OS) and inflammation. OS results from the imbalance between the production of Reactive Oxygen Species (ROS) and the antioxidant defense systems. OS leads to damage to macromolecules such as lipids (peroxidation, etc.), DNA (strand breaks, etc.) and proteins (carbonylation, etc.). These lesions can be responsible of severe cellular damage and cause physiological dysfunction and cell death [8,9]. ROS are produced immediately after irradiation but also by subsequent waves which could, among other things, come from inflammatory phenomena. An increase in the level of ROS can also occur due to hypoxia of the tissues, resulting from an alteration in microvascularization, disturbing the balance between ROS and nitric oxide. OS-related reactions have also been observed in many cases of fibrogenesis [10]. Interestingly, *in vitro* studies have shown the presence of OS late after irradiation in dermal fibroblasts [11] and endothelial cells of the dermis microvasculature [12]. Among antioxidant defenses, non-enzymatic scavengers like glutathione constitute the first line of defense. Then, enzymatic systems are of major importance like: Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione Peroxydase (GPx). Although the origin of late lesions is still debatable, the role of the OS and the cytokine cascade by the recruitment of the immune system seems to be preponderant in the appearance of late skin side effects after RT. Long-term chronic inflammation after irradiation leads to the appearance of OS waves which can lead to damage to the macromolecules, premature senescence or cell death by apoptosis or necrosis.

Identifying and targeting some biomarkers to predict radiation toxicities and evaluating the biological effects of ROS in order to understand all the mechanisms leading to toxicity is of main interest in the field of radiation oncology. Several biomarkers have been studied and identified on various biological compartments such as urine, skin biopsies or blood. Blood is the most accessible in clinical practice for the implementation of a predictive technique on a larger scale and seems the most promising for the prediction of late skin effects [13,14]. In addition, Núñez et al. showed a correlation between the biomarkers evaluated in the blood and in skin biopsies [15]. Among blood biomarkers, lymphocyte apoptosis was the most used to discriminate patients presenting low or high grade of toxicity in general after RT [5,16,17]. More particularly, concerning late cutaneous toxicity, Azria et al. demonstrated a correlation between a low apoptosis rate of CD8 T lymphocytes after *ex vivo* irradiation at 8 Gy and the occurrence of late skin toxicity greater than grade 2 [7,18]. The authors validated the RadioInduced CD8 T-Lymphocyte Apoptosis (RILA) test as a tool for the prediction of the risk of breast fibrosis. They extended this test to acute toxicity and others cancers with different thresholds of apoptosis having to be determined and with a limitation due to variations in the protocol due to blood sample collection times leading to changes in RILA values [19]. Other biomarkers were studied in blood as 8-oxodG which was shown to increase in *ex vivo* irradiated blood serum from patients without skin side effects while no increase was measured in patients with

grade 3 or 4 [20]. DNA damage was also assessed by micronucleus [21] and comet assays [22] on peripheral blood lymphocytes but results were contradictory and did not allow to discriminate patients presenting or not skin side effects after irradiation. More generally, if we are not only interested in cutaneous skin side effects, the measurement of double-stranded DNA breaks by γ -H2AX in lymphocytes has shown a correlation between the side effects of RT in general and a reduced DNA repair capacity [23,24]. Sprung et al. reviewed a list of cytokine profiles developed in various experimental studies that can be used to predict radiation toxicity [14]. Inflammation was also assessed by measuring C-Reactive Protein (CRP) in blood showing a higher level in patients with early skin side effects greater than grade 2 [25] and should be evaluated later after treatment. Most of the other studies on predicting the occurrence of side effects after RT relate to pulmonary side effects after RT treatment of lung cancer [26,27]. If the specific lung markers are eliminated, the remaining markers tested for their predictive value are cytokines levels, activities of antioxidant enzymes, polymorphism of ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) and TGF- β 1 and proteomic analysis of plasma. Indeed, levels of TGF- β [28,29], IL-1 α and IL-6 [30], IL-8 [31] and ICAM-1 [32] allowed to discriminate patients developing radiation pneumonitis. Concerning antioxidant enzymes, patients developing radiation pneumonitis showed higher SOD activity and lower GPx activity in erythrocytes compared to patients without side effects [33]. The polymorphism of ATM measured in the leukocytes of patients made it possible to associate it with an increased risk of radiation pneumonia [34] whereas the polymorphism of TGF- β 1 could not be associated with an increased risk of pulmonary side effects [35,36]. Finally, proteomic analysis of plasma has shown that certain proteins are overexpressed in patients with high pulmonary toxicity [37,38] and a new method of analysis has revealed that α -2-macroglobulin can significantly dissociate patients with or without pulmonary side effects [39]. Genomic and proteomic approaches are being developed, knowing that the variability of cell types, locations, patients, RT protocols and study protocols remains a limiting factor.

The most common locations for studies of skin side effects are breast tumors. Indeed, Rodriguez-Gil et al. [25] showed that, 6 weeks after conventional RT treatment for breast cancer, 50% of patients had early side effects greater than grade 2. However, the treatment of mammary tumors is often combined, RT being generally associated with chemotherapy, and the dosimetry is not very fine. Our goal being to observe the interindividual variations of the responses to the RT, we had to avoid the parameters which could influence these responses. The ideal location for this study is therefore Merkel Cell Carcinomas (MCC), since the treatment with RT is not combined to another, the surface of irradiated skin is extensive and the dosimetry is precise. MCC is a rare aggressive neuroendocrine skin cancer that occurs mainly in previously photodamaged skin in older people [40]. In this way, knowing that aging, as well as photoaging, influences the response of skin to RT, age of the patients must be taken into account [41], as well as skin phototype which was shown to influence the response to RT [42]. MCC is located principally in the head/neck (48–53%) and extremities (34–35%) [43,44]. Current treatments are mainly surgery, RT and more recently immunotherapy with the use of Avelumab which showed high efficiency against metastatic MCC [45].

For this study, patients treated by adjuvant RT for MCC were separated into groups according to the grade of late cutaneous toxicity developed. This parameter was assessed depending on the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) [46]. Two groups were established: (i) patients with no or little toxicity (grade 0, 1 or 2 of the RTOG) and (ii) patients with marked toxicity (grade 3 or 4 of the RTOG). The aim of our study was to highlight one or more blood biomarkers of apoptosis, genotoxicity, OS and inflammation, the variations of which after ex vivo irradiation could be used to predict the occurrence of late skin side effects after RT.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents

RPMI and FBS were obtained from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), DNA-Prep Reagent Kit from Beckman Coulter (Brea, CA, USA), NADPH from Roche (Mannheim, Germany), Legendplex™ Human Inflammation Panel from BioLegend (San Diego, CA, USA) and MILLIPLEX® MAP Kit and Superoxide Dismutase Assay kit II from Merck (Kenilworth, NJ, USA). All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA).

2.2. Patients

Among the recruited patients treated by RT for MCC at the Cancer Center François Baclesse, two groups of 9 patients were constituted according to their skin toxicity grade. One of these groups called “Tox ≥ 3 ” presented extensive skin lesions (grade 3 or 4 of the RTOG/EORTC). The other group called “Tox ≤ 2 ” presented no or slight skin side effects (grade 0, 1 or 2 of the RTOG/EORTC). The procedures of this study were reviewed and approved by the committee of protection of person (2016-A02021-50; approval date: 01/31/2017). The collection of clinical and dosimetric data was carried out during a follow-up consultation. Late skin toxicity was assessed after signing an informed consent. Blood samples were collected on 6 heparinized tubes. Possible confounding factors were collected: diabetic status, high blood pressure, vitamins and antioxidants taking, treatments in progress at the time of inclusion and at the time of treatment, body mass index or BMI, phototype according to the classification of Fitzpatrick and any other intercurrent pathologies.

2.3. Irradiation

Irradiation of blood samples was performed by 6 MV photon beams from an ARTISTE linear accelerator (Siemens) at room temperature in the RT department of Cancer Center François Baclesse. The dose rate used was the standard rate in conventional treatment: 2 Gy/min. The delivered doses were 2 and 10 Gy and corresponded respectively to 290 and 1450 MU (monitor units). The unirradiated control blood samples were transported under the same conditions to the RT department but were not irradiated. At the end of the irradiation, samples were placed for 1 h in a cell culture incubator at 37 °C and 5% CO₂ with a controlled humidity level.

2.4. Separation of Blood Components

A total volume of 8 mL per irradiation dose (0, 2 and 10 Gy) was collected. For each condition, 3 mL were used for lymphocyte cycle analysis. The remaining 5 mL per dose per patient was placed in tubes and centrifuged to separate the different blood components. For cycle and apoptosis, samples were diluted in 3 mL of PBS and then divided into 3 cytometry tubes each containing 1.5 mL of Ficoll. The triplicate samples were centrifuged at 400× g for 35 min (room temperature, no brake) to separate the different blood components and recover a clean lymphocyte ring. For other measurements, blood components were separated by centrifugation only. After 10 min of centrifugation at 1100× g at room temperature, 3 compartments were obtained and treated as followed: (i) the plasma was aliquoted and frozen at −80 °C, (ii) the lymphocyte ring was used for micronucleus study and (iii) the erythrocyte pellet was aliquoted in the same way as the plasma and frozen at −80 °C.

2.5. Lymphocyte Cycle and Apoptosis

Lymphocyte rings were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin. The culture was initiated by adding 60 μM of phytohemagglutinin (PHA) on a 6-well plate and placed in an incubator at 37 °C and of 5% CO₂ in a humid atmosphere. After 48 h of incubation, the content of each culture well was transferred into a tube and then centrifuged at 150× g for 5 min at room temperature. After washing with PBS and centrifugation, cells were fixed in 70% ethanol and stored at −20 °C. Before flow cytometry analysis, alcohol was removed and cells were washed with PBS and incubated at 37 °C during 30 min. After 5 min centrifugation at 2700× g, the DNA-Prep Reagent Kit was used according to the manufacturer’s recommendations. In brief, cells were resuspended in the presence of Lysing Permeabilizing Reagent (LPR) then marked with STAIN solution containing RNase and Propidium Iodide (PI). Cells were

incubated at room temperature during 20 min in the dark and transferred in specific cytometry tubes for analysis. Sample analysis was performed using a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) within one week after sample collection. The fluorescence of IP was collected in the FL3 channel with 620 nm bandpass filter. The singulets were selected using an area versus peak DNA content histogram and then analysed in a single-parameter histogram FL3 lin. The cycle data were analyzed according to the distribution of the lymphocytes in the different phases: sub-G1 corresponding to the apoptotic cells, G1 phase, G2-M phase and S phase. Data were then acquired with Gallios software and analysed with Kaluza software (Beckman Coulter).

2.6. Micronucleus Frequency in Lymphocytes

The lymphocyte ring of each sample was put in 6-well plates containing RPMI 1640 culture medium (10% Fetal Bovine Serum or FCS, 1% penicillin/streptomycin) in addition to 60 μ M of phytohemagglutinin (PHA) to stimulate cell division of T cells. Plates were incubated at 37 °C and 5% CO₂ in a humidified atmosphere. After 44 h of incubation, cytochalasin B was added to a final concentration of 5 μ g/mL in each culture well to block cytokinesis. After an additional 28 h of incubation, the content of each well was transferred to a FACS tube, centrifuged at 180 \times g for 10 min at room temperature. Lymphocytes pellets were then subjected to a hypotonic shock by adding 75 mM KCl dropwise over 10 min. The content of each pellet was finally spread on 3 slides on humidified paper towels before drying and storage at –20 °C. For the analysis, labeling was carried out by adding 40 μ L of mounting medium containing DAPI and a coverslip on each slide. Analysis was performed under 10 \times magnification using an automated scoring system Metafer (MetaSystems, Altussheim, Germany) coupled with a fluorescence microscope (Zeiss) in order to quantify the micronuclei frequency and distribution by binucleated lymphocytes.

2.7. Lysis of Erythrocytes

Erythrocytes were placed in a lysis buffer (10 mM Tris/HCl, 0.1% Triton, 200 mM sucrose, pH 7.5) and lysed by thermal shock: 1 min in liquid nitrogen and 1 min at 37 °C. This step was repeated 3 times, then samples were centrifuged at 4 °C at 2000 \times g for 30 min. The supernatants obtained were aliquoted in Eppendorf tubes and stored at –80 °C.

2.8. Protein Quantification in Erythrocyte Lysates

Protein assay was performed by using a protein quantification Kit-Rapid according to the manufacturer's recommendations. In brief, 6 μ L of diluted samples were mixed with 300 μ L of Coomassie Brilliant Blue, then the absorbance was measured at 595 nm using a microplate reader (Fluostar Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Germany). Protein concentration was determined using the standard curve equation.

2.9. SOD activity in Erythrocyte Lysates

Total SOD activity was measured using Superoxide Dismutase Assay kit II according to the manufacturer's recommendations. The SOD assay relies on the detection of superoxide radicals which are generated by xanthine oxidase and hypoxanthine via a tetrazolium salt. The absorbance was measured at 450 nm by using a Fluostar Omega microplate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). The standard curve established with different concentrations of standards was used to calculate the SOD activity. Results are expressed in units per mg of proteins.

2.10. CAT Activity in Erythrocyte Lysates

CAT activity was assayed using the Clairborne and Aebi spectrophotometric method [47]. In brief, erythrocyte lysates were diluted in a 50 mM potassium phosphate buffer (99:1, *v:v*). Twenty-five microliters of diluted samples were dispensed in UV-star plates (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria). The reaction was initiated by the addition of 225 μ L of hydrogen peroxide (30 mM). The decrease in absorbance at 240 nm was monitored by a Flexstation 3 microplate reader

(Molecular Devices, San Jose, CA, USA) for 1 min. CAT activity was calculated using slope values from standard bovine purified liver CAT. Results are expressed as nmol of consumed hydrogen peroxide per min per mg of proteins.

2.11. GPx Activity in Erythrocyte Lysates

GPx activity was assayed using Sinet method with slight modifications [48]. Briefly, erythrocyte lysates were diluted (1/625) in a buffer containing 125 mM potassium phosphate buffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7), 12.5 mM EDTA, 50 mM KCN, 5 mM reduced glutathione, 5 mM NADPH and 0.25 UI of Glutathione Reductase. Diluted samples were distributed in 96-well plates and incubated at 30 °C during 15 min. Reaction was initiated by the addition of 250 μM of Tert Butyl Hydroperoxydase. The decrease in absorbance at 340 nm was monitored with a Fluostar Omega microplate reader (BMG Labtech) for 2.5 min. GPx activity was determined by the calculation below and results were expressed as nmol of oxidized GSH (GSSG) per min per mg of proteins.

$$\text{GPx Activity} = 2 \times \frac{\frac{|\text{slope}| (\text{AU} \cdot \text{min}^{-1})}{\epsilon_{\text{NADPH}} (\text{cm}^{-1}) \times l (\text{cm})} \times \frac{V_f (\text{mL})}{V_s (\text{mL})} \times \text{sample dilution}}{\text{protein concentration (mg/mL)}}$$

AU: Absorbance Unit, ϵ : molar extinction coefficient for NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate) at 340 nm ($0.00622 \mu\text{m}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), l : optical path length, V_f : final volume per well, V_s : volume of diluted sample

2.12. Quantification of Reduced and Oxidized Glutathione in Erythrocyte Lysates

A quantification kit was used to measure oxidized and reduced glutathione according to the manufacturer's recommendations. The amounts of total glutathione (reduced and oxidized) were determined by an enzymatic method. Briefly, GSSG (glutathione disulfide, oxidized form) was first reduced to GSH (reduced form of glutathione) by the addition of NADPH and glutathione reductase in controlled amounts. 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid reacts with GSH to form a product detectable by spectrophotometry at 412 nm. To assay only oxidized glutathione, a masking reagent was added to the samples to trap the initial GSH. Levels of GSH and GSSG in samples were measured by a microplate reader (Model 680, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and calculated from GSH and GSSG standard curve respectively. Results are expressed in μmol of GSH or GSSG per mg of proteins.

2.13. Protein Carbonylation in Erythrocyte Lysates

Protein carbonylation measurement was performed using a protein carbonyl content assay kit according to the manufacturer's recommendations. In brief, erythrocyte lysates were first derived in dinitrophenyl (DNP) hydrazone adducts in the presence of 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH). The addition of trichloroacetic acid allowed the precipitation of proteins. An acetone washing step was carried out to remove excess DNPH and to retain only the proteins. After centrifugation, pellets were suspended in a 6 M guanidine solution. The absorbance was measured at 375 nm by a Fluostar Omega microplate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). The amount of protein carbonyls was calculated using the formula below. Results are expressed as nmol of carbonyls per mg of proteins.

$$\text{Protein carbonyls (nmol carbonyls/mg protein)} = (C/P) \times 1000 \times D$$

C: amount of carbonyls in sample wells (nmol/well), P: amount of proteins from standard wells, D: dilution factor of samples, 1000: conversion factor (μg to mg)

2.14. Lipid Peroxidation in Erythrocyte Lysates

Lipid peroxidation was measured using PeroxiDetect Kit according to the manufacturer's recommendations. Typically, peroxides react with Fe^{2+} ions to produce Fe^{3+} ions in the same proportion to the amount of hydroperoxides initially present in samples. The Fe^{3+} ions then react with the xylenol orange (3,3'-bis[N,N-bis(carboxymethyl)aminomethyl]-o-cresolsulfonephthalein, sodium salt) and form a colored compound which can be detected by spectrophotometry at 570 nm. The

amount of lipid hydroperoxide was measured by a microplate reader (Model 680, Bio-Rad) and calculated from the standard curve of tert-Butyl Hydroperoxide (t-BuOOH). Results are expressed as nmol of peroxides per mg of proteins.

2.15. Quantification of Inflammatory Cytokines in Plasma by Flow Cytometry

2.15.1. Legendplex™ Human Inflammation Panel

A panel of 13 cytokines (IL-1 β , IFN- α 2, IFN- γ , TNF- α , MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-23, IL-33) was quantified in plasma using Legend plex™ Human Inflammation Panel according to the manufacturer's recommendations. In brief, fluorescent encoded beads coated with specific antibodies on their surface capture the analytes. After an incubation and a washing step, the biotinylated detection antibody is added and binds to its specific analyte. Finally, streptavidin-phycoerythrin (SA-PE) is used as a reporter. Flow cytometry analysis was performed using a CytoFlex flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). The configuration used was 585 nm with a blue laser (FL-1A) and 690 nm with a yellow laser (FL-9A). Finally, data were analyzed using LEGENDplex™ version 8 data analysis software (BioLegend, San Diego, CA, USA).

2.15.2. Milliplex® MAP Kit: TGF- β 1 Single Plex Magnetic Bead Kit

TGF- β 1 cytokine was quantified using MILLIPLEX® MAP Kit according to the manufacturer's recommendations. Briefly, fluorescent magnetic beads coated with TGF- β 1 antibodies capture the analyte, then a biotinylated detection antibody binds to this complex and SA-PE (Streptavidin Phycoerythrin) is used as a reporter. The MAGPIX reader (Luminex corp, Avatia, TX, USA) was used to capture images. Finally, data were analyzed using xPONENT® software (Luminex corp, Avatia, TX, USA).

2.16. Statistical Analysis

Data are depicted as mean values \pm standard error of the mean (SEM). * for $p < 0.05$, ** for $p < 0.001$ and *** for $p < 0.0001$ for irradiated samples compared to non-irradiated ones and # for $p < 0.05$ and ## for $p < 0.005$ for Tox ≥ 3 compared to Tox ≤ 2 group (two-way ANOVA and Mann–Whitney test). Each experiment was performed in triplicates.

3. Results

3.1. Patient Profiles

Eighteen patients were included in this study (Table 1). Each group contained nine patients according to their RTOG late skin toxicity classification. The average age of the patients included was around 70 years old as expected for the MCC pathology characterized by elderly patients. There were no significant differences in terms of received irradiation dose, BED (Biological Effective Dose with $\alpha/\beta = 3$), cardiovascular risk factor number (diabetic status, hypertension, and obesity with a Body Mass Index ≥ 30 , in addition to age), tobacco consumption or grade of acute toxicity after RT (data not shown). Late skin toxicity was assessed by a junior and a senior radiation therapist based on clinical observations and according to RTOG/EORTC classification (Figure 1).

Table 1. Characteristics of the cohort depending on the toxicity group. Age, RTOG (Radiation Therapy Oncology Group)/EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer) grade of late skin toxicity, total received dose, BED (Biological Effective dose) with $\alpha/\beta = 3$, treatment year, gender and Fitzpatrick skin type are reported here. Groups Tox ≤ 2 and Tox ≥ 3 correspond to patients presenting grade 2 or less and grade 3 or more of late skin reactions after RT according to RTOG/EORTC, respectively.

Group	Patient Number	Age	RTOG G	Dose (Gy)	BED (Gy3)	Treatment Year	Gen der	Fitzpatrick Skin Type
-------	----------------	-----	--------	-----------	-----------	----------------	---------	-----------------------

	1	80	0	40	93.33	2016	F	4
	2	75	2	50	83.33	2014	F	2
	3	61	1	50	83.33	2014	M	1
	4	76	1	44	102.67	2011	M	3
Tox ≤ 2	5	77	1	50	83.33	2015	M	3
	6	74	1	50	83.33	2016	F	2
	7	56	0	50	83.33	2013	M	2
	8	91	1	48	86.40	2012	M	2
	9	71	0	50	83.33	2016	M	4
Mean ±		73.44 ±		48.00 ±	86.93 ±			
SD		3.62		1.27	2.39			
	10	58	3	50	83.33	2015	F	2
	11	82	3	48	86.40	2006	M	2
	12	71	3	50	83.33	2016	M	2
	13	79	4	48	86.40	2010	F	3
Tox ≥ 3	14	72	3	40	93.33	2014	F	3
	15	65	3	50	83.33	2011	M	2
	16	69	3	48	86.40	2013	F	2
	17	84	3	48	86.40	2015	M	3
	18	88	3	48	86.40	2015	F	2
Mean ±		74.22 ±		47.77 ±	86.14 ±			
SD		3.45		1.09	1.09			

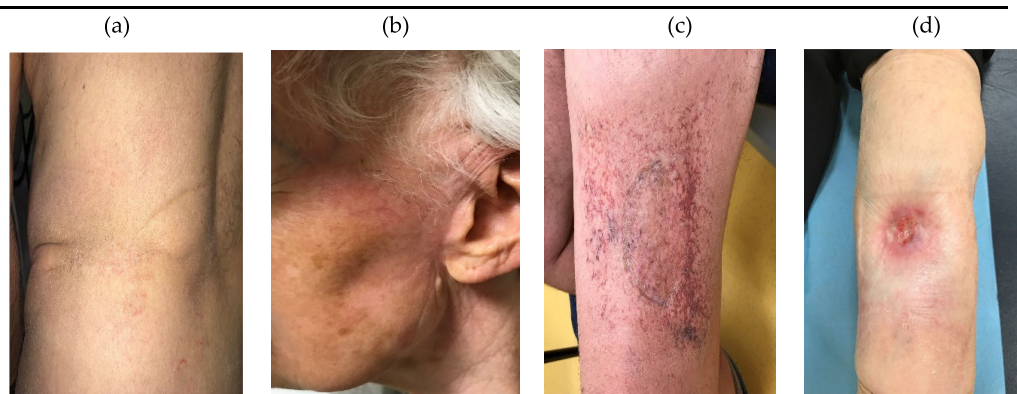


Figure 1. Pictures of some patient irradiated skin regions: (a) patient with grade 0 toxicity (no fibrosis, no telangiectasia); (b) patient with grade 1 toxicity (no fibrosis, imperceptible telangiectasia); (c,d) patients with grade 3 toxicity (pronounced fibrosis, marked telangiectasia).

3.2. Cell Cycle and Apoptosis

Percentage of lymphocytes in each phase of the cell cycle was evaluated by flow cytometry. In both groups of patients, the rate of sub-G1 phase (corresponding to apoptosis) increased with irradiation (Figure 2a). This increase was only significant for the Tox ≤ 2 group with a 1.8-fold change at 10 Gy. Moreover, a significant difference exists between the two groups of patients with a 1.25-fold decrease in the Tox ≥ 3 group compared to the Tox ≤ 2 group. The proportion of cells in S phase was significantly reduced after 10 Gy irradiation in the same manner for both groups with a 1.41-fold and a 1.71-fold decrease in the Tox ≤ 2 group and in the Tox ≥ 3 group, respectively (Figure 2b). There is

no significant difference concerning the G2-M phase for both groups even if a tendency towards a decrease in the percentage of lymphocytes in G2-M phase has been observed after irradiation. When comparing the two groups of patients, a non-significant increase was measured in the Tox \geq 3 group compared to the Tox \leq 2 group even in unirradiated blood samples (Figure 2c). Regarding the G0-G1 phase, no difference was observed after irradiation or between both groups of patients (data not shown). Figure 2d illustrates the modification of the cell cycle profile of a patient of the Tox \geq 3 group after irradiation at 10 Gy.

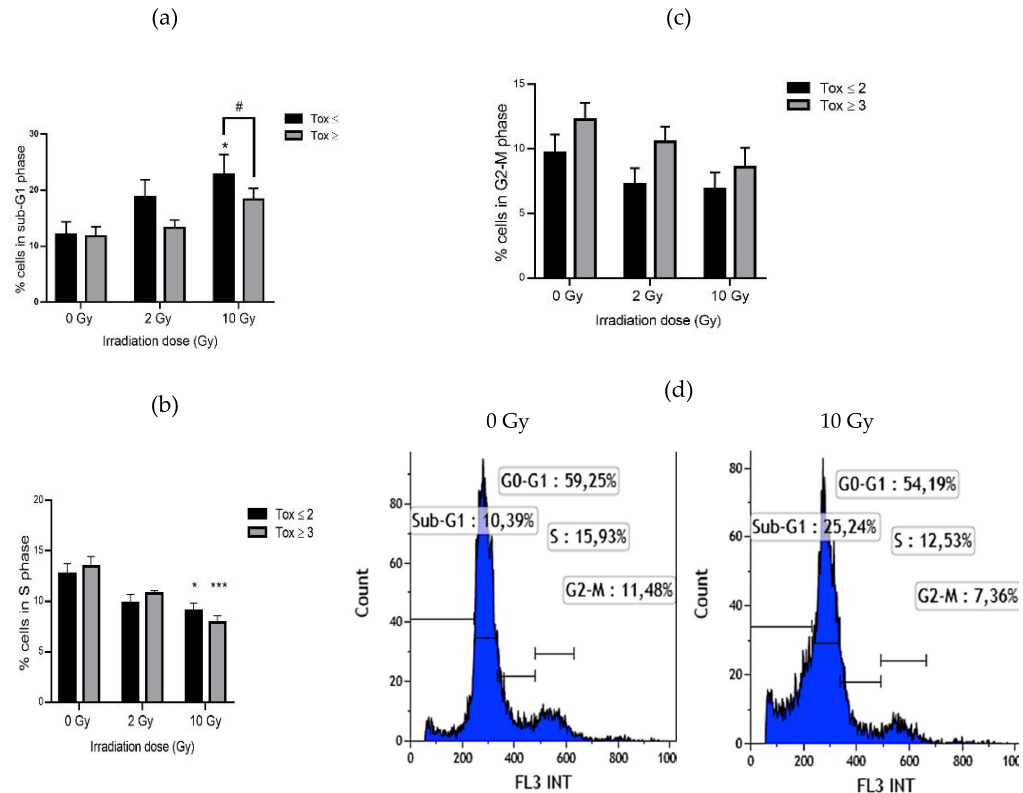


Figure 2. Lymphocyte percentage in sub-G1 phase (a), in S phase (b) and in G2-M phase (c) in both groups of patients and example of analysis of cell cycle for one patient (d). Groups Tox \leq 2 and Tox \geq 3 correspond to patients presenting grade 2 or less and grade 3 or more of late skin reactions after RT according to RTOG/EORTC, respectively. * for $p < 0.05$ and *** for $p < 0.0001$ for irradiated samples compared to non-irradiated ones and # for $p < 0.05$ for Tox \geq 3 compared to Tox \leq 2 group.

3.3. Micronucleus Assay

Genotoxicity was assessed by the micronucleus assay. Micronuclei contain a chromosome or fragment(s) of chromatid(s) which have not been incorporated into one of the daughter nuclei after cell division. Micronucleus assay has been used to evaluate poorly repaired or unrepaired DNA breaks or nondisjunction of chromosomes. A significant increase in micronucleus frequency was observed with irradiation as expected (Figure 3a and Table 2) with a 81-fold increase in MN frequency in irradiated compared to non-irradiated lymphocytes in the Tox \leq 2 group compared to a 17-fold increase in the Tox \geq 3 group. This difference between the two groups of patients was significant with a 3.31-fold decrease in the Tox \geq 3 compared to the Tox \leq 2 group. These results were confirmed by examining the distribution of micronuclei with an increase in each class of the distribution of micronuclei in the Tox \leq 2 compared to the Tox \geq 3 group (Figure 3b and Table 3).

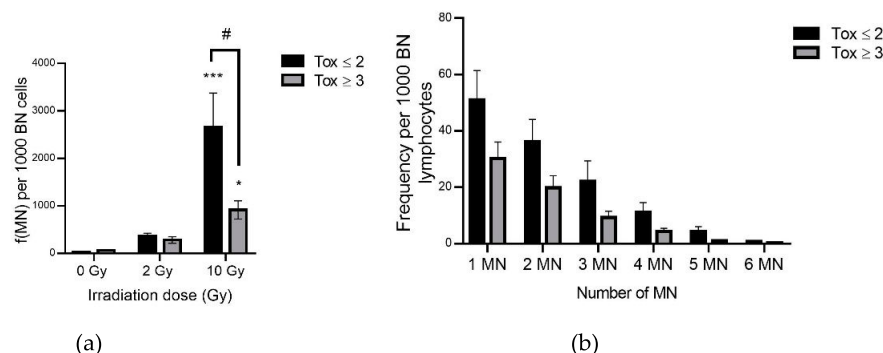


Figure 3. Micronucleus frequency (a) and distribution at 10 Gy (b) per 1000 binucleated lymphocytes in both groups of patients. Groups Tox ≤ 2 and Tox ≥ 3 correspond to patients presenting grade 2 or less and grade 3 or more of late skin reactions after RT according to RTOG/EORTC, respectively. * for $p < 0.05$ and *** for $p < 0.0001$ for irradiated samples compared to non-irradiated ones and # for $p < 0.05$ for Tox ≥ 3 compared to Tox ≤ 2 group.

Table 2. Micronucleus frequency per 1000 binucleated lymphocytes in both groups of patients. Groups Tox ≤ 2 and Tox ≥ 3 correspond to patients presenting grade 2 or less and grade 3 or more of late skin reactions after RT according to RTOG/EORTC, respectively. * for $p < 0.05$ and *** for $p < 0.0001$ for irradiated samples compared to non-irradiated ones and # for $p < 0.05$ for Tox ≥ 3 compared to Tox ≤ 2 group.

Irradiation Dose (Gy)	0		2		10	
	Tox ≤ 2	Tox ≥ 3	Tox ≤ 2	Tox ≥ 3	Tox ≤ 2	Tox ≥ 3
f(MN) per 1000 BN cells	29.51 ± 8.16	61.68 ± 16.62	362.07 ± 65.81	280.56 ± 69.15	2663.13 ± 765.09 ***	916.31 ± 190.10 *#

Table 3. Micronucleus distribution at 10 Gy in both groups of patients. Groups Tox ≤ 2 and Tox ≥ 3 correspond to patients presenting grade 2 or less and grade 3 or more of late skin reactions after RT according to RTOG/EORTC, respectively.

Micronucleus Distribution at 10 Gy (Number of MN)	1 MN	2 MN	3 MN	4 MN	5 MN	6 MN
	Toxicity group					
Tox ≤ 2	47.22 ± 7.63	41.23 ± 9.55	26.46 ± 9.46	12.64 ± 4.59	5.35 ± 2.40	0.92 ± 0.38
Tox ≥ 3	40.64 ± 8.49	22.95 ± 6.58	11.04 ± 4.33	4.82 ± 1.97	0.93 ± 0.36	0.16 ± 0.18

3.4. Antioxidant Enzyme Activities in Erythrocyte Lysates

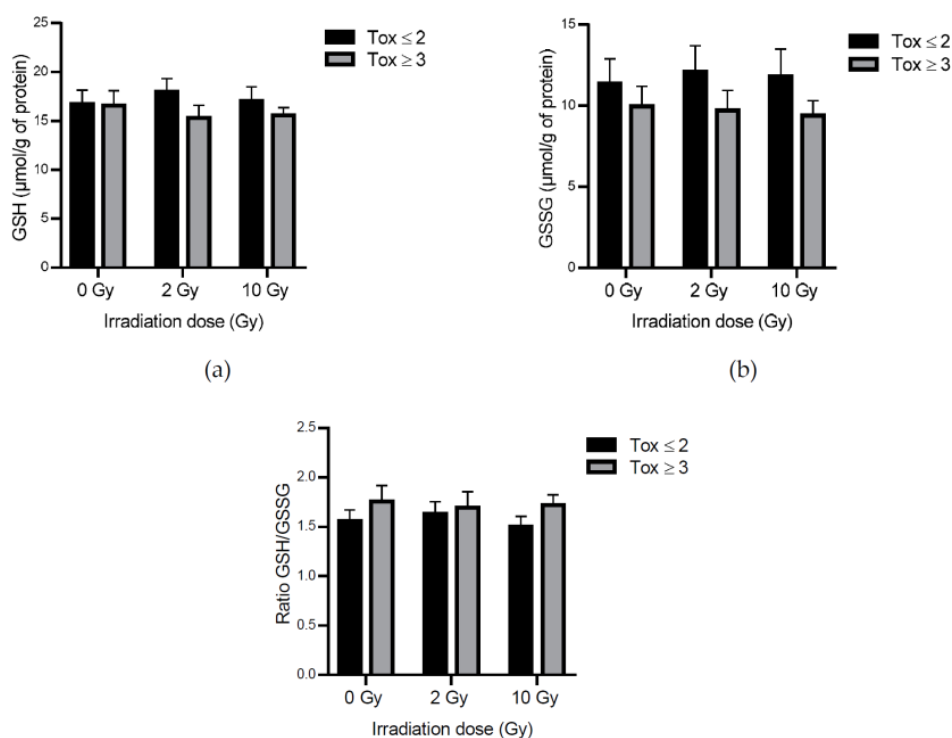
Measuring the activity of the three potent enzymes (SOD, GPx and CAT) gives an idea of the antioxidant capacity of erythrocytes since these enzymes are the second line of the enzymatic antioxidant defense chain after non-enzymatic antioxidant components such as vitamins E/C and some small molecules like ubiquinon and glutathione. Differences were observed between the two groups of patients with decreasing trends for the three enzymes of the Tox ≥ 3 compared to the Tox ≤ 2 group (Table 4). With regard to SOD, this trend was significant, reaching a 1.47-fold decrease at 2 Gy.

Table 4. Antioxidant enzyme activities in erythrocyte lysates in both groups of patients. Groups Tox ≤ 2 and Tox ≥ 3 correspond to patients presenting grade 2 or less and grade 3 or more of late skin reactions after RT according to RTOG/EORTC, respectively. Percentages of increase and decrease were calculated to compare Tox ≥ 3 vs. Tox ≤ 2 group. # for $p < 0.05$ and ## for $p < 0.005$ for Tox ≥ 3 compared to Tox ≤ 2 group.

Irradiation Dose (Gy)		0			2			10		
Toxicity Group		Tox ≤ 2	Tox ≥ 3	% Increase ↑	Tox ≤ 2	Tox ≥ 3	% Increase ↑	Tox ≤ 2	Tox ≥ 3	% Increase ↑
				% Decrease ↓			% Decrease ↓			% Decrease ↓
Antioxidant enzyme activity	Superoxide dismutase (U/mg protein)	10.13 ± 1.2	9.23 ± 1.8	8.88% ↓	10.84 ± 1.45	7.36 ± 1.43	32.10% ↓ [‡]	10.01 ± 1.3	6.91 ± 1.2	30.97% ↓ ^{##}
	Glutathione peroxidase (nmol of oxidized glutathione /min/mg protein)	41.59 ± 5.21	35.87 ± 5.91	13.75% ↓	43.69 ± 5.41	38.47 ± 5.15	11.95% ↓	45.46 ± 5.35	38.28 ± 4.54	15.79% ↓
	Catalase (U/mg protein)	10.76 ± 1.90	8.89 ± 0.87	17.37% ↓	9.24 ± 0.51	8.89 ± 0.99	3.78% ↓	9.89 ± 0.84	9.11 ± 0.86	7.88% ↓

3.5. Reduced and Oxidized Glutathione in Erythrocytes Lysates

The measurement of reduced and oxidized glutathione levels allows evaluating the cellular oxidative state. Reduced and oxidized glutathione levels were analyzed. Levels of reduced and oxidized glutathione have remained statistically unchanged in the global population with or without irradiation (Figure 4). However, trends towards a decrease in GSH (Figure 4a) and GSSG (Figure 4b) were observed in the Tox ≥ 3 compared to the Tox ≤ 2 group reaching a 1.24-fold decrease concerning oxidized glutathione. In addition, the GSH/GSSG ratio was 1.14-fold increased in the Tox ≥ 3 compared to the Tox ≤ 2 group at 10 Gy (Figure 4c).



(c)

Figure 4. Reduced (a) and oxidized glutathione (b) and GSH (reduced glutathione)/GSSG (oxidized glutathione) ratio (c) in erythrocytes lysates in both groups of patients. Groups Tox \leq 2 and Tox \geq 3 correspond to patients presenting grade 2 or less and grade 3 or more of late skin reactions after radiotherapy according to RTOG/EORTC, respectively.

3.6. Protein Carbonylation and Lipid Peroxidation in Erythrocytes Lysates

The quantification of protein carbonylation and lipid peroxidation in erythrocyte homogenates was analyzed to assess lipid and protein oxidation in blood samples from both groups of patients. No significant difference was observed with the irradiation, nor according to the group of toxicity (Table 5). A tendency to a decrease in protein carbonylation was observed in irradiated blood of the most radiosensitive patients compared to the less radiosensitive ones with a 1.18-fold decrease in the Tox \geq 3 group compared to a 1.02-fold increase in the Tox \leq 2 group (10 Gy vs 0 Gy).

Table 5. Protein carbonylation and lipid peroxidation in erythrocyte lysates in both groups of patients. Groups Tox \leq 2 and Tox \geq 3 correspond to patients presenting grade 2 or less and grade 3 or more of late skin reactions after RT according to RTOG/EORTC, respectively. Percentages of increase and decrease were calculated to compare Tox \geq 3 vs. Tox \leq 2 group.

Irradiation Dose (Gy)	0			2			10		
	Tox \leq 2	Tox \geq 3	% Increase \uparrow % Decrease \downarrow	Tox \leq 2	Tox \geq 3	% Increase \uparrow % Decrease \downarrow	Tox \leq 2	Tox \geq 3	% Increase \uparrow % Decrease \downarrow
Carbonyls									
(nmol carbonyl/mg of protein)	173.87 \pm 21.5	180.86 \pm 20.75	4.02%	175.22 \pm 21.41	157.63 \pm 15.55	10.04% \downarrow	176.73 \pm 15.45	152.77 \pm 13.8	13.56% \downarrow
Lipid									
peroxidation (nmol/mg of protein)	21.79 \pm 1.96	22.52 \pm 1.52	3.35%	21.50 \pm 1.81	23.45 \pm 1.66	9.07%	21.45 \pm 1.91	20.87 \pm 1.02	2.70% \downarrow

3.7. Inflammatory Cytokines in Plasma

The plasma levels of 14 cytokines involved in the mechanisms of inflammation and the regulation of the immune system response were tested in both groups of patients at 0 and 10 Gy. The levels of IL-1/6/10/12p70/17A/23/33 and IFN- α 2/ γ were generally below the detection threshold (data not shown). The MCP-1 and IL-18 levels were above the detection threshold but without any significance or any trend after irradiation or between both groups of patients (data not shown). Regarding TNF- α , it should be noted that a non-significant increase was observed after irradiation with a tendency to decrease in the Tox \geq 3 compared to the Tox \leq 2 group reaching a 2.54-fold change (Figure 5a). IL-8 plasmatic concentration was strongly, but not significantly, increased in the Tox \geq 3 compared to the Tox \leq 2 group, even in the non-irradiated blood samples with a 2.49-fold change at 0 Gy and a 1.58-fold change at 10 Gy (Figure 5b). Interestingly, there is no strong effect of irradiation on IL-8 level. In the same way, TGF- β 1 plasmatic concentration was significantly increased in the Tox \geq 3 compared to the Tox \leq 2 group with a 1.32-fold change at 0 Gy and a 1.61-fold change at 10 Gy (Figure 5c). Moreover, irradiation tends to decrease TGF- β 1 level in both groups with a 1.40-fold decrease after irradiation for the Tox \leq 2 group and a 1.15-fold decrease after irradiation for the Tox \geq 3 group.

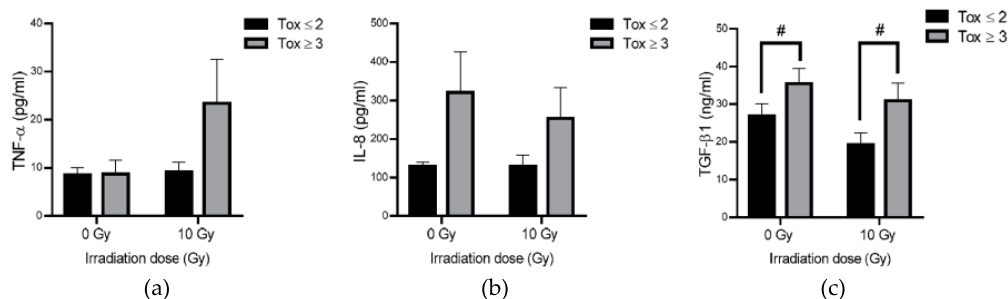


Figure 5. TNF- α (Tumor Necrosis Factor α) (a), IL-8 (Interleukin 8) (b) and TGF- β 1 (Transforming Growth Factor β 1) (c) concentration in plasma in both groups of patients. Groups Tox \leq 2 and Tox \geq 3 correspond to patients presenting grade 2 or less and grade 3 or more of late skin reactions after RT according to RTOG/EORTC, respectively. # for $p < 0.05$ for Tox \geq 3 compared to Tox \leq 2 group.

4. Discussion

The aim of this study was to assess biomarkers of genotoxicity, OS and inflammation in blood of MCC patients in order to discriminate patients who develop severe or mild late cutaneous side effects after RT. For this purpose, blood samples from two groups of nine patients, constituted according to their toxicity grade, were collected and irradiated *ex vivo*.

The patient's late skin toxicity grade was evaluated as described by RTOG/EORTC knowing that (i) slight atrophy, change in pigmentation, hair loss and moderate telangiectasia were classified as grade 1 or 2 and (ii) marked atrophy, ulceration and strong telangiectasia were classified as grade 3 or 4 (Figure 1). Skin grafts were performed on the nine patients in the Tox \leq 2 group and on 5/9 patients in the Tox \geq 3 group. The 18 patients recruited for this study completed a survey before blood collection in which different parameters were taken into account as the location of the tumor, the total dose received during treatment, the biological effective dose, the development of acute and/or late toxicities, Fitzpatrick phototype as well as age, cardiovascular diseases (diabetes, hypertension and obesity) and tobacco consumption. Among these patients there were no significant difference between the 2 groups (Table 1).

As expected, lymphocyte apoptosis was increased after irradiation (Figure 2). As shown by Azria et al. [18], this increase was higher in patients presenting lower late skin toxicity. These results suggest that lymphocytes of patients with higher late skin toxicity cannot undergo apoptosis as are patients with less radiosensitivity. This difference in apoptosis in both groups of patients could be linked to the TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) pathway. Indeed, a higher expression of TRAIL has been observed in radiosensitive T4 effector memory lymphocytes compared to radioresistant ones [49]. Further studies are needed to investigate the role of TRAIL-R knowing that TRAIL-R1 or -R2 are in favor of a pro-apoptotic pathway while TRAIL-R4 is related to an anti-apoptotic pathway via NF- κ B [50,51]. The lower rate of apoptosis in patients with higher toxicity may be correlated with a non-significant increase in G2-M arrest in these patients. Interestingly, this trend to an increase in the G2-M phase was observed even in unirradiated samples. However, probably due to the small number of patients, these changes were not statistically significant. In addition, the results concerning lymphocyte micronucleus frequency showed a significant lower increase after irradiation in the most radiosensitive patients (Figure 3a and Table 2). This could be related to a misrepair of DNA damage leading to fewer micronuclei but bringing potentially stochastic effects. Lymphocytes of the least radiosensitive patients, presenting more micronuclei resulting from DNA damage and repair, could continue to progress in the cell cycle with less G2-M arrest for DNA repair, possibly inhibited by the p21 pathway, to finally undergo apoptosis as shown by sub-G1 cell percentage analysis. In contrast, lymphocytes from the most radiosensitive patients have fewer micronuclei perhaps due to the elimination of the most damaged cells by mitotic death. These results

were consistent with the study of Skiöld et al. on the oxidized base 8-oxodG which was increased in ex vivo irradiated blood only in patients presenting no skin side effects [20].

Blood antioxidant capacity was assessed by the measurement of SOD, CAT, GPx, GSH and GSSG in erythrocytes as red blood cells are considered as the main actors of blood ROS elimination [52]. After irradiation, the antioxidant levels in erythrocytes decreased in the most radiosensitive patients. This reduction concerned GPx, CAT, glutathione but was only significant for SOD which plays a central role in the detoxification of ROS (Table 4 and Figure 4). These trends were observed for almost all antioxidants even in unirradiated samples. Results obtained at the basal level (i.e., unirradiated blood) are difficult to compare with the data in the literature because of the different methods used and the variety of expression of the results (per volume, per mg of proteins or hemoglobin etc.). Although OS has been extensively studied in various pathologies such as diabetes, Alzheimer's disease, and in aging, there are no validated data of reference levels in blood. The decrease in SOD level in the most radiosensitive patients could not be correlated with the results observed concerning early pulmonary side effects after irradiation in C3H/HeN mice: an increase in erythrocyte SOD activity was linked to an increase in radiation pneumonitis [33]. However, Park et al. [33] also demonstrated a decrease in the activity of glutathione peroxidase in human erythrocytes which is in agreement with our results. The slight, non-significant decrease in GPx activity in the most radiosensitive patients was correlated with a slight, non-significant increase in the GSH/GSSG ratio. It might be interesting to assess the activity of glutathione reductase to explain this GSH/GSSG ratio. The level of lipid peroxidation and protein carbonylation was statistically unchanged in the two groups of patients with only a tendency to decrease carbonyls after irradiation in the most radiosensitive patients (Table 5). Altogether, these results suggest that the most radiosensitive patients seemed to present a decrease in defense mechanisms resulting in a decrease in ROS detoxification.

The previous results are consistent with what has been observed concerning inflammation (Figure 5). A significant increase in TGF- β 1 was measured in plasma samples from the most radiosensitive patients. This increase could explain an inhibition of a pro-apoptotic pathway via ATM and NF- κ B, knowing that TNF- α was not significantly increased in these patients, so that TRAIL-R4 could be of major interest to study. Moreover, IL-8, which was not significantly increased in the most radiosensitive patients, is known to induce angiogenesis and tissue remodeling [53]. An increase in inflammation, measured by the blood level of CRP (C-reactive protein) in the most sensitive patients to early skin side effects of RT, was also observed by Rodriguez-Gil et al. [25]. It is also known that localized irradiation can lead to a late increase in inflammatory status. As shown by Liao et al. on C57Bl6 mice 4 weeks after irradiation, IL1 β and IL23 were strongly upregulated especially IL-17, which is responsible for upregulating $\gamma\delta$ T cells involved in mediating innate immune response, playing an important role on skin inflammation and thus on the appearance of radiation dermatitis [54]. Since inflammation is also a source of ROS, the decrease in antioxidant capacity in the most radiosensitive patients could not help to detoxify the overproduction of ROS in these patients. Interestingly, the basal rate of plasmatic cytokines was higher in radiosensitive patients suggesting that these patients present a higher inflammatory status than the least radiosensitive ones. Aging, which make patients more vulnerable to RT, could also be critical point to take into consideration as it could influence inflammatory response [55]. This difference in basal rates between both groups of patients can be correlated with the study of Anscher et al. [28] in which they demonstrate that TGF- β 1 rate was higher in the group of patients who developed pneumonitis after RT. It has to be noted that IL-6 level was below the detection threshold even in irradiated blood which is surprising compared to previous published results [56]. Moreover, as reviewed by Mavragani et al. [57], DNA damage/repair and chronic inflammation powered by the induction of DNA damage response are the most important factors to take into account for the prediction of radiation effects.

5. Conclusions

In conclusion, the results that we obtained on 18 patients showed a high interindividual variability in radiosensitivity between patients as expected. The use of skin biopsies would be more

relevant, especially concerning DNA damage [58,59], inflammation [60], survival [61] and gene expression profile [62,63] but difficult to obtain from every patients before their RT and the methods would be more arduous to implement on a large scale. Moreover, skin aging, especially in the case of MCC patients, should be evaluated before RT. In this way, targeting dermal fibroblasts, especially myofibroblast by using for example alpha-SMA (Smooth Muscle Actin) as a biomarker could give an indication on the microenvironment of the tissue as well as its role on biological radiation effects [64,65]. Nevertheless, this study allowed us to highlight differences between patients with high or low grades of late skin side effects after RT. In patients presenting low grades of late skin radiation toxicity, cell death by apoptosis or mitotic death associated to high micronucleus frequency may help to eliminate the damaged cells. In addition, the most radiosensitive patients present a decrease in antioxidant capacity and an increase in inflammatory cytokines. Therefore, the use of a group of biomarkers seemed to be more relevant to ensure a better prediction of side effects of RT. To confirm these findings and to improve the statistical power in order to establish prediction models, it is of major importance to enlarge the number of patients. The ultimate goal would be to extend the study to other tumor sites than MCC. This will undoubtedly be complex since, for example, age differences between patients will result in different baseline levels of biomarkers of OS. Furthermore, according to the results obtained, it would be interesting to investigate DNA repair systems and signaling pathways leading to apoptosis, as well as transcriptional and post-translational modifications which could explain differences observed in OS and inflammation biomarkers. Concerning DNA damage, Mavragani et al. [57] pointed out the major role of clustered DNA damage and the use of Monte-Carlo prediction model but also the interest of using bioinformatics and omics approaches. Currently, genomic and proteomic approaches are in full development knowing that the variability of cell types, locations, patients, RT protocols remains a limiting factor. Finally, the discrimination of patients who will or will not experience side effects of RT could allow (i) to prevent these effects by adapting their treatment before RT, (ii) to treat side effects by using treatments during and after RT [66,67] or (iii) to use these knowledge to improve treatments [68].

Author Contributions: Conceptualization, C.L., D.S., D.D.L., V.B., F.S., A.L. (Alexandra Leconte), J.-M.G. and J.-L.H.; methodology, C.L., D.D.L., A.L. (Alexandra Leconte), J.-M.G., M.G. and V.B.; formal analysis, C.L., D.D.L., S.C. and A.L. (Alexandre Leduc); investigation, C.L., D.D.L., S.C., A.Leduc, V.B. and M.G.; writing—original draft preparation, C.L. and S.C.; writing—review and editing, D.D.L., D.S., A.L. (Alexandre Leduc), M.G., F.S. and J.-L.H.; supervision, C.L.; project administration, C.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: The authors would like to thank the Radiation Physics Department and Pr Marc-André Mahé, head of the Cancer Centre François Baclesse.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Baskar, R.; Lee, K.; Yeo, R.; Yeoh, K.W. Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *Int. J. Med. Sci.* **2012**, *9*, 193–199.
2. Berkey, F.J. Managing the adverse effects of radiation therapy. *Am. Fam. Physician* **2010**, *82*, 381–388, 394.
3. Emami, B.; Lyman, J.; Brown, A.; Coia, L.; Goitein, M.; Munzenrider, J.E.; Shank, B.; Solin, L.J.; Wesson, M. Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1991**, *21*, 109–122.
4. Archambeau, J.O.; Pezner, R.; Wasserman, T. Pathophysiology of irradiated skin and breast. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1995**, *31*, 1171–1185.
5. Bordón, E.; Henríquez Hernández, L.A.; Lara, P.C.; Pinar, B.; Fontes, F.; Rodríguez Gallego, C.; Lloret, M. Prediction of clinical toxicity in localized cervical carcinoma by radio-induced apoptosis study in peripheral blood lymphocytes (PBLs). *Radiat. Oncol.* **2009**, *4*, 58.
6. Crompton, N.E.A.; Shi, Y.Q.; Emery, G.C.; Wisser, L.; Blattmann, H.; Maier, A.; Li, L.; Schindler, D.; Ozsahin, H.; Ozsahin, M. Sources of variation in patient response to radiation treatment. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2001**, *49*, 547–554.
7. Lacombe, J.; Riou, O.; Solassol, J.; Mangé, A.; Bourgier, C.; Fenoglietto, P.; Pèlerin, A.; Ozsahin, M.; Azria,

- D. Radiosensibilité individuelle : Les tests vont changer nos pratiques. *Cancer Radiother.* **2013**, *17*, 337–343.
8. Pandey, K.B.; Rizvi, S.I. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2010**, *3*, 2–12.
 9. Marrocco, I.; Altieri, F.; Peluso, I. Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 6501046.
 10. Robbins, M.E.C.; Zhao, W. Chronic oxidative stress and radiation-induced late normal tissue injury: A review. *Int. J. Radiat. Biol.* **2004**, *80*, 251–259.
 11. Laurent, C.; Leduc, A.; Pottier, I.; Prévost, V.; Sichel, F.; Lefaix, J.L. Dramatic increase in oxidative stress in carbon-irradiated normal human skin fibroblasts. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e85158.
 12. Laurent, C.; Voisin, P.; Pouget, J.P. DNA damage in cultured skin microvascular endothelial cells exposed to gamma rays and treated by the combination pentoxifylline and alpha-tocopherol. *Int. J. Radiat. Biol.* **2006**, *82*, 309–321.
 13. Lacombe, J.; Sima, C.; Amundson, S.A.; Zenhausern, F. Candidate gene biodosimetry markers of exposure to external ionizing radiation in human blood: A systematic review. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0198851.
 14. Sprung, C.N.; Forrester, H.B.; Siva, S.; Martin, O.A. Immunological markers that predict radiation toxicity. *Cancer Lett.* **2015**, *368*, 191–197.
 15. Núñez, M.I.; Guerrero, M.R.; López, E.; Moral, M.R.D.; Valenzuela, M.; Siles, E.; Villalobos, M.; Pedraza, V.; Peacock, J.H.; Almodóvar, J.M.R.D. DNA damage and prediction of radiation response in lymphocytes and epidermal skin human cells. *Int. J. Cancer* **1998**, *76*, 354–361.
 16. Schnarr, K.; Boreham, D.; Sathya, J.; Julian, J.; Dayes, I.S. Radiation-induced lymphocyte apoptosis to predict radiation therapy late toxicity in prostate cancer patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2009**, *74*, 1424–1430.
 17. Ozsahin, M.; Crompton, N.E.A.; Gourgou, S.; Kramar, A.; Li, L.; Shi, Y.; Sozzi, W.J.; Zouhair, A.; Mirimanoff, R.O.; Azria, D. CD4 and CD8 T-lymphocyte apoptosis can predict radiation-induced late toxicity: A prospective study in 399 patients. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 7426–7433.
 18. Azria, D.; Riou, O.; Castan, F.; Nguyen, T.D.; Peignaux, K.; Lemanski, C.; Lagrange, J.L.; Kirova, Y.; Lartigau, E.; Belkacemi, Y.; et al. Radiation-induced CD8 T-lymphocyte Apoptosis as a Predictor of Breast Fibrosis After Radiotherapy: Results of the Prospective Multicenter French Trial. *EBioMedicine* **2015**, *2*, 1965–1973.
 19. Talbot, C.J.; Veldwijk, M.R.; Azria, D.; Batini, C.; Bierbaum, M.; Brengues, M.; Chang-Claude, J.; Johnson, K.; Keller, A.; Smith, S.; et al. Multi-centre technical evaluation of the radiation-induced lymphocyte apoptosis assay as a predictive test for radiotherapy toxicity. *Clin. Transl. Radiat. Oncol.* **2019**, *18*, 1–8.
 20. Skiöld, S.; Naslund, I.; Brehwens, K.; Andersson, A.; Wersall, P.; Lidbrink, E.; Harms-Ringdahl, M.; Wojcik, A.; Haghdooost, S. Radiation-induced stress response in peripheral blood of breast cancer patients differs between patients with severe acute skin reactions and patients with no side effects to radiotherapy. *Mutat. Res.* **2013**, *756*, 152–157.
 21. Barber, J.B.; Burrill, W.; Spreadborough, A.R.; Levine, E.; Warren, C.; Kiltie, A.E.; Roberts, S.A.; Scott, D. Relationship between in vitro chromosomal radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes and the expression of normal tissue damage following radiotherapy for breast cancer. *Radiother. Oncol.* **2000**, *55*, 179–186.
 22. O.; Ebbeler, R.; Twardella, D.; Helmbold, I.; Gotzes, F.; Schmezer, P.; Thielmann, H.W.; von Fournier, D.; Haase, W.; Sautter-Bihl, M.L.; et al. Radiation-induced DNA damage and repair in lymphocytes from breast cancer patients and their correlation with acute skin reactions to radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2003**, *55*, 1216–1225.
 23. Bourton, E.C.; Plowman, P.N.; Smith, D.; Arlett, C.F.; Parris, C.N. Prolonged expression of the γ -H2AX DNA repair biomarker correlates with excess acute and chronic toxicity from radiotherapy treatment. *Int. J. Cancer* **2011**, *129*, 2928–2934.
 24. Pouliliou, S.E.; Lialiaris, T.S.; Dimitriou, T.; Giatromanolaki, A.; Papazoglou, D.; Pappa, A.; Pisteovou, K.; Kalamida, D.; Koukourakis, M.I. Survival Fraction at 2 Gy and γ H2AX Expression Kinetics in Peripheral Blood Lymphocytes From Cancer Patients: Relationship With Acute Radiation-Induced Toxicities. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2015**, *92*, 667–674.
 25. Rodriguez-Gil, J.L.; Takita, C.; Wright, J.; Reis, I.M.; Zhao, W.; Lally, B.E.; Hu, J.J. Inflammatory biomarker C-reactive protein and radiotherapy-induced early adverse skin reactions in patients with breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2014**, *23*, 1873–1883.

26. Giridhar, P.; Mallick, S.; Rath, G.K.; Julka, P.K. Radiation induced lung injury: Prediction, assessment and management. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2015**, *16*, 2613–2617.
27. Rube, C.E.; Rodemann, H.P.; Rube, C. The relevance of cytokines in the radiation-induced lung reaction. Experimental basis and clinical significance. *Strahlenther. Onkol.* **2004**, *180*, 541–549.
28. Anscher, M.S.; Kong, F.M.; Andrews, K.; Clough, R.; Marks, L.B.; Bentel, G.; Jirtle, R.L. Plasma transforming growth factor beta1 as a predictor of radiation pneumonitis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1998**, *41*, 1029–1035.
29. Zhao, L.; Sheldon, K.; Chen, M.; Yin, M.S.; Hayman, J.A.; Kalemkerian, G.P.; Arenberg, D.; Lyons, S.E.; Curtis, J.L.; Davis, M.; et al. The predictive role of plasma TGF-beta1 during radiation therapy for radiation-induced lung toxicity deserves further study in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **2008**, *59*, 232–239.
30. Chen, Y.; Hyrien, O.; Williams, J.; Okunieff, P.; Smudzin, T.; Rubin, P. Interleukin (IL)-1A and IL-6: Applications to the predictive diagnostic testing of radiation pneumonitis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2005**, *62*, 260–266.
31. Stenmark, M.H.; Cai, X.W.; Shedden, K.; Hayman, J.A.; Yuan, S.; Ritter, T.; Ten Haken, R.K.; Lawrence, T.S.; Kong, F.M.S. Combining Physical and Biologic Parameters to Predict Radiation-Induced Lung Toxicity in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Treated With Definitive Radiation Therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2012**, *84*, e217–e222.
32. Tsujisaki, M.; Imai, K.; Hirata, H.; Hanzawa, Y.; Masuya, J.; Nakano, T.; Sugiyama, T.; Matsui, M.; Hinoda, Y.; Yachi, A. Detection of circulating intercellular adhesion molecule-1 antigen in malignant diseases. *Clin. Exp. Immunol.* **1991**, *85*, 3–8.
33. Park, E.M.; Ramnath, N.; Yang, G.Y.; Ahn, J.Y.; Park, Y.; Lee, T.; Shin, H.S.; Yu, J.; Ip, C.; Park, Y.M. High superoxide dismutase and low glutathione peroxidase activities in red blood cells predict susceptibility of lung cancer patients to radiation pneumonitis. *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *42*, 280–287.
34. Xiong, H.; Liao, Z.; Liu, Z.; Xu, T.; Wang, Q.; Liu, H.; Komaki, R.; Gomez, D.; Wang, L.E.; Wei, Q. ATM polymorphisms predict severe radiation pneumonitis in patients with non-small cell lung cancer treated with definitive radiation therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2013**, *85*, 1066–1073.
35. Barnett, G.C.; Elliott, R.M.; Alsner, J.; Andreassen, C.N.; Abdelhay, O.; Burnet, N.G.; Chang-Claude, J.; Coles, C.E.; Gutiérrez-Enríquez, S.; Fuentes-Raspall, M.J.; et al. Individual patient data meta-analysis shows no association between the SNP rs1800469 in TGFB and late radiotherapy toxicity. *Radiother. Oncol.* **2012**, *105*, 289–295.
36. Voets, A.M.; Oberije, C.; Struijk, R.B.; Reymen, B.; De Ruyck, K.; Thierens, H.; Vandecasteele, K.; De Neve, W.; Houben, R.; De Ruysscher, D.; et al. No association between TGF-β1 polymorphisms and radiation-induced lung toxicity in a European cohort of lung cancer patients. *Radiother. Oncol.* **2012**, *105*, 296–298.
37. Cai, X.W.; Shedden, K.; Ao, X.; Davis, M.; Fu, X.L.; Lawrence, T.S.; Lubman, D.M.; Kong, F.M.S. Plasma proteomic analysis may identify new markers for radiation-induced lung toxicity in patients with non-small-cell lung cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2010**, *77*, 867–876.
38. Cai, X.W.; Shedden, K.A.; Yuan, S.H.; Davis, M.A.; Xu, L.Y.; Xie, C.Y.; Fu, X.L.; Lawrence, T.S.; Lubman, D.M.; Kong, F.M.S. Baseline plasma proteomic analysis to identify biomarkers that predict radiation-induced lung toxicity in patients receiving radiation for non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* **2011**, *6*, 1073–1078.
39. Oh, J.H.; Craft, J.M.; Townsend, R.; Deasy, J.O.; Bradley, J.D.; El Naqa, I. A bioinformatics approach for biomarker identification in radiation-induced lung inflammation from limited proteomics data. *J. Proteom. Res.* **2011**, *10*, 1406–1415.
40. Tothill, R.; Estall, V.; Rischin, D. Merkel cell carcinoma: Emerging biology, current approaches, and future directions. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* **2015**, *35*, e519–e526.
41. Geinitz, H.; Zimmermann, F.B.; Molls, M. [Radiotherapy of the elderly patient. Radiotherapy tolerance and results in older patients]. *Strahlenther. Onkol.* **1999**, *175*, 119–127.
42. Hochman, B.; Farkas, C.; Isoldi, F.; Ferrara, S.; Furtado, F.; Ferreira, L. Distribuição de queiloide e cicatriz hipertrófica segundo fototipos de pele de Fitzpatrick. *Rev. Brasileira Cir. Plást.* **2012**, *27*, 185–189.
43. Lebbe, C.; Becker, J.; Grob, J.J.; Malvehy, J.; Del Marmol, V.; Pehamberger, H.; Peris, K.; Saiag, P.; Middleton, M.R.; Bastholt, L.; et al. Diagnosis and treatment of Merkel Cell Carcinoma. European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur. J. Cancer* **2015**, *51*, 2396–2403.
44. Caldarelli, C.; Autorino, U.; Iaquina, C.; De Marchi, A. Merkel cell carcinoma of the forehead area: A

- literature review and case report. *Oral Maxillofac Surg* **2019**, *23*, 365–373.
45. Shirley, M. Avelumab: A Review in Metastatic Merkel Cell Carcinoma. *Target. Oncol.* **2018**, *13*, 409–416.
 46. Cox, J.D.; Stetz, J.; Pajak, T.F. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1995**, *31*, 1341–1346.
 47. Aebi, H. Catalase in vitro. *Meth. Enzymol.* **1984**, *105*, 121–126.
 48. Sinet, P.M.; Michelson, A.M.; Bazin, A.; Lejeune, J.; Jerome, H. Increase in glutathione peroxidase activity in erythrocytes from trisomy 21 subjects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, *67*, 910–915.
 49. Baijer, J.; Déchamps, N.; Perdry, H.; Morales, P.; Kerns, S.; Vasilescu, A.; Baulande, S.; Azria, D.; Roméo, P.H.; Schmitz, A. TNFSF10/TRAIL regulates human T4 effector memory lymphocyte radiosensitivity and predicts radiation-induced acute and subacute dermatitis. *Oncotarget* **2016**, *7*, 21416–21427.
 50. Staniek, J.; Lorenzetti, R.; Heller, B.; Janowska, I.; Schneider, P.; Unger, S.; Warnatz, K.; Seidl, M.; Venhoff, N.; Thiel, J.; et al. TRAIL-R1 and TRAIL-R2 Mediate TRAIL-Dependent Apoptosis in Activated Primary Human B Lymphocytes. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 951.
 51. Degli-Esposti, M.A.; Dougall, W.C.; Smolak, P.J.; Waugh, J.Y.; Smith, C.A.; Goodwin, R.G. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF- κ B and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* **1997**, *7*, 813–820.
 52. Klemm, A.; Voigt, C.; Friedrich, M.; Fünfstück, R.; Sperschneider, H.; Jäger, E.-G.; Stein, G. Determination of erythrocyte antioxidant capacity in haemodialysis patients using electron paramagnetic resonance. *Nephrol. Dial. Transplant* **2001**, *16*, 2166–2171.
 53. Waugh, D.J.J.; Wilson, C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 6735–6741.
 54. Liao, W.; Hei, T.K.; Cheng, S.K. Radiation-Induced Dermatitis is Mediated by IL17-Expressing $\gamma\delta$ T Cells. *Radiat. Res.* **2017**, *187*, 454–464.
 55. Rea, I.M.; Gibson, D.S.; McGilligan, V.; McNerlan, S.E.; Alexander, H.D.; Ross, O.A. Age and Age-Related Diseases: Role of Inflammation Triggers and Cytokines. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 586.
 56. De Sanctis, V.; Agolli, L.; Visco, V.; Monaco, F.; Muni, R.; Spagnoli, A.; Campanella, B.; Valeriani, M.; Minniti, G.; Osti, M.F.; et al. Cytokines, Fatigue, and Cutaneous Erythema in Early Stage Breast Cancer Patients Receiving Adjuvant Radiation Therapy. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 523568.
 57. Mavragani, I.V.; Nikitaki, Z.; Kalospyros, S.A.; Georgakilas, A.G. Ionizing Radiation and Complex DNA Damage: From Prediction to Detection Challenges and Biological Significance. *Cancers* **2019**, *11*, 1789.
 58. Oppitz, U.; Denzinger, S.; Nachtrab, U.; Flentje, M.; Stopper, H. Radiation-induced comet-formation in human skin fibroblasts from radiotherapy patients with different normal tissue reactions. *Strahlenther. Onkol.* **1999**, *175*, 341–346.
 59. Nachtrab Radiation-induced micronucleus formation in human skin fibroblasts of patients showing severe and normal tissue damage after radiotherapy. *Int. J. Radiat. Biol.* **1998**, *73*, 279–287.
 60. Quarmby, S.; West, C.; Magee, B.; Stewart, A.; Hunter, R.; Kumar, S. Differential expression of cytokine genes in fibroblasts derived from skin biopsies of patients who developed minimal or severe normal tissue damage after radiotherapy. *Radiat. Res.* **2002**, *157*, 243–248.
 61. Burnet, N.G.; Nyman, J.; Turesson, I.; Wurm, R.; Yarnold, J.R.; Peacock, J.H. Prediction of normal-tissue tolerance to radiotherapy from in-vitro cellular radiation sensitivity. *Lancet* **1992**, *339*, 1570–1571.
 62. Rødningsen, O.K.; Børresen-Dale, A.L.; Alsner, J.; Hastie, T.; Overgaard, J. Radiation-induced gene expression in human subcutaneous fibroblasts is predictive of radiation-induced fibrosis. *Radiother. Oncol.* **2008**, *86*, 314–320.
 63. Andreassen, C.N.; Overgaard, J.; Alsner, J. Independent prospective validation of a predictive test for risk of radiation induced fibrosis based on the gene expression pattern in fibroblasts irradiated in vitro. *Radiother. Oncol.* **2013**, *108*, 469–472.
 64. Strnadova, K.; Sandera, V.; Dvorankova, B.; Kodet, O.; Duskova, M.; Smetana, K.; Lacina, L. Skin aging: The dermal perspective. *Clin. Dermatol.* **2019**, *37*, 326–335.
 65. Ji, X.; Zhu, X.; Lu, X. Effect of cancer-associated fibroblasts on radiosensitivity of cancer cells. *Future Oncol.* **2017**, *13*, 1537–1550.
 66. Delanian, S.; Porcher, R.; Balla-Mekias, S.; Lefaix, J.L. Randomized, placebo-controlled trial of combined pentoxifylline and tocopherol for regression of superficial radiation-induced fibrosis. *J. Clin. Oncol.* **2003**, *21*, 2545–2550.
 67. Herst, P.M.; Bennett, N.C.; Sutherland, A.E.; Peszynski, R.I.; Paterson, D.B.; Jasperse, M.L. Prophylactic use

of Mepitel Film prevents radiation-induced moist desquamation in an intra-patient randomised controlled clinical trial of 78 breast cancer patients. *Radiother. Oncol.* **2014**, *110*, 137–143.

68. Moss, R.W. Do antioxidants interfere with radiation therapy for cancer? *Integr. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 281–292.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Article 2 : Side effects of scattered *versus* scanned proton beams on normal tissues in total body irradiated mice: survival, genotoxicity, oxidative stress and inflammation

Le programme ESPRITS (Effets Secondaires de la PRotonthérapie liées à l'Irradiation des Tissus Sains) s'intéresse à la survenue d'effets secondaires chez la souris irradiée corps entier par des faisceaux de protons thérapeutiques. En effet, il n'existe pas à notre connaissance d'études comparatives sur les tissus sains des deux technologies utilisées actuellement : le balayage actif (PBS) ou la diffusion passive (DS) du faisceau de protons (cf Chapitre 2, 3.2., p.54). Matsubara *et al.* (Matsubara et al. 2018) ont montré que le balayage de faisceaux d'ions carbone n'était pas toujours supérieur à la méthode passive. De plus, les TPS (Treatment Planning System) actuels peuvent ne pas être adaptés au balayage de faisceau selon Tommasino *et al.* (Tommasino et Durante 2015). L'utilisation de modèles murins permet de comparer scrupuleusement ces 2 techniques ainsi que de prélever non seulement le sang, mais aussi les organes sains d'intérêt.

L'objectif de cette étude est d'observer la réponse des tissus sains (sang, cœur, peau, poumons) après l'irradiation dans des modèles de rongeurs sélectionnés pour leur capacité à induire de tels effets secondaires. Pour cela, des souris C57Bl6 ont été irradiées corps entier dans la phase plateau en amont du SOB (Spread-Out Bragg Peak, pic de Bragg étalé) en DS (Figure 38) ou PBS à différentes doses par le faisceau 230 MeV du C230 (Figure 39) du Centre de Protonthérapie d'Orsay. Le sang et les organes sélectionnés ont été prélevés 3 mois après irradiation. Les réponses biologiques aux 2 modes de délivrance des faisceaux de protons étudiées sont : la survie des souris, la génotoxicité lymphocytaire, le stress oxydatif et l'inflammation dans les tissus sains.



Figure 38. Roue de modulation avec des secteurs de différentes épaisseurs permettant l'obtention d'un SOB en mode DS.

Les irradiations ainsi que les prélèvements d'organes ont été réalisés au Centre de Protonthérapie d'Orsay. L'analyse des micronoyaux lymphocytaires a été réalisée selon la technique CBMN (Cytokinesis Blocked MicroNucleus) couplée

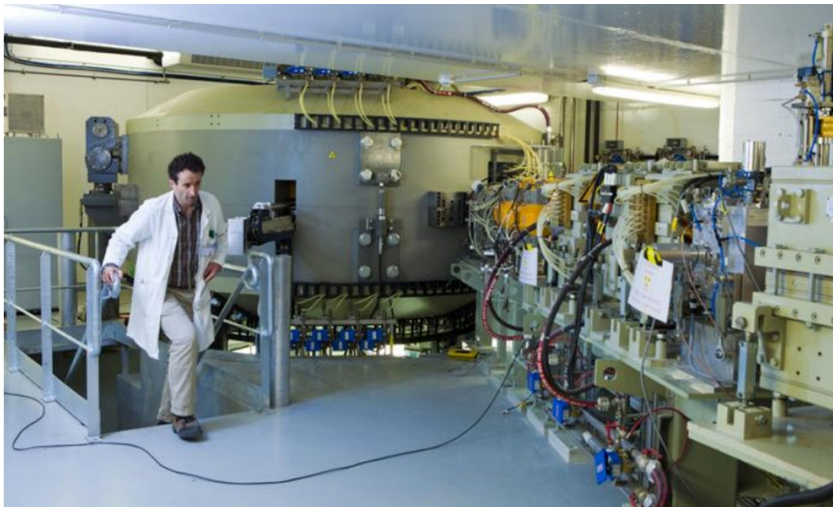


Figure 39. Le cyclotron C230 d'IBA (230 MeV). D'après (Calugaru 2011)

à une analyse d'images automatisée via le logiciel Metafer (MetaSystems). Le dosage des activités des enzymes antioxydantes dans les tissus sains a été réalisé par des méthodes biochimiques : méthode de Flohé et Otting pour la SOD, méthode de Sinet pour la GPx et méthode de Clairborne et Aebi pour la catalase. La carbonylation des protéines et la peroxydation des lipides dans les tissus sains ont été quantifiées par des kits commerciaux. Enfin, un kit LEGENDPLEX couplé à une analyse par cytométrie en flux (Cytotflex-S) a été utilisé pour l'étude d'un panel de 13 cytokines dans le plasma.

L'ensemble des résultats a été rapporté à la quantité de protéines présentes dans chaque échantillon dosé préalablement selon la méthode de Bradford.

Ce projet a été mené en collaboration avec le Dr Frédéric Pouzoulet qui dirige la plateforme RadeXP (Institut Curie-Centre de Protonthérapie d'Orsay), le Dr Ludovic De Marzi, physicien médical (Service de Physique Médicale du Centre de Protonthérapie d'Orsay), le Dr Frédérique Megnin-Chanet, radiobiologiste (unité INSERM U1196/UMR9187 CMIB de l'Institut Curie-Centre de Recherche à Orsay) et le Dr Dinu Stefan et le Pr Jean-Louis Habrand, radiothérapeutes (CLCC Baclesse).

Les résultats les plus notables sont :

- Qu'il existe encore 3 mois après irradiation des variations de génotoxicité, de capacité antioxydante et d'oxydation des lipides et des protéines. Celles-ci pourraient être dues à une production persistante et/ou tardive d'ERO après irradiation.
- Qu'il y a des différences de réponses entre les souris exposées aux faisceaux balayés versus diffusés. Même si aucune différence de survie n'est observée entre les faisceaux balayés et diffusés, des variations existent au niveau des biomarqueurs étudiés. Ainsi, la capacité antioxydante des tissus sains est plutôt augmentée avec le faisceau balayé. En revanche, concernant les lésions des macromolécules biologiques, la fréquence des micronoyaux lymphocytaires ainsi que la carbonylation des protéines et la peroxydation des lipides dans les tissus sains est globalement plus élevée avec le faisceau balayé.

Des irradiations corps entier aux rayons X sont en cours de réalisation (retard lié au Covid-19) afin d'avoir un point de comparaison correspondant à la RT conventionnelle.

La toxicité de l'hadronthérapie est très peu étudiée alors que de récents cas cliniques ont montré qu'il existe des toxicités en protons chez l'enfant et avec les ions carbone chez l'adulte et l'enfant. De même, un travail antérieur dans le laboratoire a montré une augmentation de la toxicité sur des cultures primaires de peau exposées à des ions carbone comparativement aux rayons X. Il convient donc de ne pas sous-estimer l'EBR des tissus sains et de se soucier du mode de délivrance des faisceaux d'hadrons. En effet, nous montrons ici que les faisceaux de protons balayés, vendus et utilisés dans les nouvelles structures, pourraient conduire à une augmentation des lésions des macromolécules biologiques.

Side effects of scattered *versus* scanned proton beams on normal tissues in total body irradiated mice: survival, genotoxicity, oxidative stress and inflammation

Samia Chaouni¹, Alexandre Leduc¹, Frédéric Pouzoulet², Ludovic De Marzi^{3,4}, Frédérique Megnin-Chanet⁵, Dinu Stefan^{1,6}, Jean-Louis Habrand^{1,6}, François Sichel¹, Carine Laurent^{1,7,†}

¹ Normandie Univ, UNICAEN, UNIROUEN, ABTE-EA4651, Caen, France ; Cancer Centre François Baclesse, Caen, France

² Translational Research Department, Experimental Radiotherapy platform Institut Curie, PSL Research University, Orsay, France

³ Institut Curie, PSL Research University, Radiation Oncology Department, Proton Therapy Centre, Centre Universitaire, 91898, Orsay, France.

⁴ Institut Curie, PSL Research University, University Paris Saclay, Inserm U 1021-CNRS UMR 3347, 91898, Orsay, France.

⁵ INSERM 1030, UNIV Paris-Sud, Univ Paris-Saclay, Department of Radiation Oncology, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France.

⁶ Radiotherapy Department, Cancer Centre François Baclesse, 14000, Caen, France

⁷ SAPHYN/ARCHADE (Advanced Resource Centre for HADrontherapy in Europe), Cancer Centre François Baclesse, 14000, Caen, France

† Correspondence: carine.laurent@unicaen.fr

Keywords: protontherapy; Double Scattering; Pencil Beam Scanning; side effects; skin; lung; heart; blood; genotoxicity; oxidative stress; inflammation

Abstract

Side effects of protontherapy are poorly studied. Moreover, the effects of dose delivery on normal tissues are not taken into account when proton beams are scanned instead of being scattered. We proposed here to study the effects of both modalities of proton beam delivery on blood, skin, lung and heart in a murine model. In that purpose, C57Bl6 mice were total body irradiated by 230 MeV proton beams either by Double Scattering (DS) or by Pencil Beam Scanning (PBS) in the plateau phase before the Spread-Out Bragg Peak (SOBP). Mouse survival was evaluated. Blood and organs were removed 3 months after irradiation. Biomarkers of genotoxicity, oxidative stress and inflammation were measured. In general, proton irradiation was shown to increase lymphocyte micronucleus frequency, lung superoxide dismutase activity, erythrocyte and skin glutathione peroxidase activity, erythrocyte catalase activity, lung, heart and skin oxidized glutathione level, erythrocyte and lung lipid peroxidation and erythrocyte protein carbonylation even 3 months post-irradiation. When comparing both methods of proton beam delivery, mouse survival was not different. However, PBS significantly increased lymphocyte micronucleus frequency, erythrocyte glutathione peroxidase activity and heart oxidized glutathione level compared to DS. These results tend to show that it is necessary to take into account the way of delivering dose in PT as it could influence late side effects.

Introduction

In a large number of cancer cases, radiotherapy (RT) by photons and/or electrons is the main tool for curing cancers. Associated or not with surgery, this therapy often allows definitive control of the tumor (Baskar et al. 2012; Loeffler et Durante 2013). However, about 15-20% of the patients treated by RT, prognosis is not improved (Laurent 2018) of RT go to failure. These failures depend on different parameters: (i) characteristics of the tumor (volume, cell kinetics, radiosensitivity, repair capacity...), (ii) its environment (hypoxia, proximity of organs at risk) (Barker et al. 2015; Brown 2000) and (iii) the radiation sensitivity of surrounding healthy tissues (Emami et al. 1991). The challenge to ameliorate RT is to increase the anti-tumoral efficiency while decreasing side effects on healthy tissues. In this way, different tracks have

been developed to improve the effectiveness of the treatment: ballistic, biomodulation and imaging in order to limit the dose to healthy tissues (Chaouni et al. 2020).

Conventional RT uses photons to irradiate cancer cells and is characterized by an exponential dose deposit that get through all the tissues. Thus the energy is deposited mainly upstream and also downstream of the tumor in healthy tissues (Girdhani, Sachs, et Hlatky 2013) leading to possible toxicities at short and/or long term after RT. In contrast, hadrontherapy, based on a better ballistic, is considered as an alternative to conventional RT for the treatment of inoperable and radio-resistant cancers (Doyen et al. 2016). It consists in targeting tumors by using an accelerated beam of hadron particles, the most used being protons (protontherapy, PT) or carbon ions (carbontherapy). Nowadays, protons are widely used instead of photons due to their ballistic properties which allow to treat tumors localized near organs at risk (OAR) without leading to toxicities in these OAR (Ilicic, Combs, et Schmid 2018). The proton path (and heavy ions) in tissues takes place in the form of a Bragg peak, so the majority of the energy is deposited at the end of the path. In this way, surrounding healthy tissues should be spared (Tommasino et Durante 2015; Girdhani, Sachs, et Hlatky 2013; Patyal 2007). PT thus allows the treatment of tumors whose location is critical such as pediatric (Lundkvist et al. 2005; Rutz et al. 2008), ocular (Taheri-Kadkhoda et al. 2008), head and neck (Miyawaki et al. 2009), breast (Björk-Eriksson et Glimelius 2005), lung (Widesott, Amichetti, et Schwarz 2008), and some urological cancers (Johansson, Ridderheim, et Glimelius 2005).

Some uncertainties constitute a limitation of PT, especially concerning the proton path in matter, this is related to the heterogeneity of the tissues crossed as well as to the calculations of the parameters planned during the treatment (Lomax 2008). In addition, the treatment of an entire tumor volume requires to spread the Bragg peak (Mohan et Grosshans 2017). This leads to an accumulation of peaks to reach the chosen dose. And so, this also leads to an accumulation of plateau phases before the Bragg peak. As a consequence, the dose on healthy tissues localized upstream of the tumor could be increased (Laurent 2018).

The state of knowledge is insufficient to answer to many questions concerning side effects of PT on healthy tissues and is limited mainly to RBE on observables related to cell death. Moreover, difficulty of access to beam line facilities, initially dedicated to physics research and their inadequacy with radiobiology experiments have limited the quantity of biological data (Tommasino et Durante 2015; Loeffler et Durante 2013). As a consequence, few studies have been performed on biological effects of proton irradiation. The only available data have been conducted most of the time *in vitro* on tumor cells and in much smaller proportion on normal cells (Girdhani et al. 2012; Gridley et al. 2011) or by some meta-analysis studies (Grutters et

al. 2010) in comparison with the large number of studies on conventional radiotherapy. Regarding *in vivo* experiments concerning side effects of protons, studies are even rarer. In general, they are in agreement with the RBE generally used for protons: 1.1 (Paganetti 2002; 2014), except the study of Clearly *et al.* where ocular toxicity was greater with an RBE between 2 and 2.6 (Clearly *et al.* 1972; 1973). More recently, Choi *et al.* also demonstrated that, in comparison to photons, proton beam irradiation can induce a higher toxicity in the gastrointestinal tract (Choi *et al.* 2019).

Today, three-dimensional RT optimizes the target volume by protecting nearby healthy organs and tissues using appropriate conformational collimators. The modulation of radiation intensity ensures a deep conformation to the target volume as well as a reduction in the dose to healthy tissues (Girdhani, Sachs, et Hlatky 2013). In this way, there is a lack of data relative to biological effects of scattered versus scanned proton beams on normal tissues. These two types of protontherapy delivery are: (i) passive or Double Scattering (DS) where beams are scattered to treat the entire volume of the tumor and, the new one, (ii) active scanning or Pencil Beam Scanning (PBS) where each beam is scanned in terms of direction and intensity is changed leading to a superposition of elemental pencil beams so that the whole volume of the tumor is scanned (St. James, Grassberger, et Lu 2018; Mishra *et al.* 2019). On one hand, passive delivery leads to an overdose in healthy tissues in the lateral parts of the proximal layers (Wang 2015). On the other hand, active scanning conducts to strong disparities in normal and tumor tissues. Indeed, dose rate is completely different between the proximal and the distal layers where dose rate can be up to dozens of Gy/s. In the same way, the duration of the fraction given by an active proton beam can go from some seconds in the distal zone compared to several minutes in the proximal layer. Fractionation is also different as the chosen dose will be given in one fraction for the most distal part of the tumor whereas it will be delivered in a large number of fractions for the most proximal part (De Marzi 2016). These properties of DS and PBS proton beams could thus lead to toxicities in surrounding healthy tissues.

Indeed, despite all the advances that have been made on this new therapy, toxicities to healthy tissues still exist. In addition to the findings of Choi *et al.* (Choi *et al.* 2019) about the relative toxicity induced by PT in mouse model, Mac Donald *et al.* showed that treatment by passive protons of the left breast cancer induces a percentage of dose non-negligible upon heart and left lung (MacDonald *et al.* 2013). Otherwise, Hall *et al.* demonstrated that PT is only effective while using the PBS whose dose is 10 times lower than that used in RT by photons (Hall 2006). In contrast, the study performed by Gridley *et al.* on the comparison of PBS and DS treatments effects on human lung epithelial cells did not show any advantage of PT by PBS compared to

DS (Gridley et al. 2015). Moreover, in patients treated for breast cancer by carbontherapy, Matsubara *et al.* have even showed that active scanning was not always superior to passive scattering (Matsubara et al. 2018). All of these results showed the necessity to carry out additional studies to determine the toxic effects related to both proton delivery techniques and also to investigate more precisely the underlying mechanisms behind the development of these secondary effects after irradiation.

Ionizing radiations lead to different cellular responses. Indeed, photons and protons can interact with oxygen and water molecules present in cells producing reactive oxygen species (ROS). Among these species, two are free oxygen radicals: the hydroxyl radical (OH^\bullet) and the superoxide anion (O_2^\bullet) (Laurent 2018; Marrocco, Altieri, et Peluso 2017). At low concentrations, ROS are involved in the modulation of cell function (differentiation, proliferation) and play a role in inflammatory reactions and as second messengers in signaling pathways. At higher concentrations, radicals can be harmful. In response to stress and in order to protect itself, cells activate biochemical defense systems involved in the metabolism of ROS such as the small molecules like HSP (Heat Shock Proteins) (Ikwegbue et al. 2017). In the case where these defense systems are overwhelmed and/or ineffective, an imbalance occurs in favor of free radicals, then oxidative stress occurs. This leads to disruption of cell signaling pathways, redox status control and/or multiple molecular damage (Azzam, Jay-Gerin, et Pain 2012). Radicals attack biological macromolecules in the direct environment of their place of production. These radicals being very reactive and therefore having a short lifespan, all biological molecules having double bonds are likely to be affected. As a consequence, degradation products are generated (oxidized bases and cleavages of nuclear and mitochondrial DNA, products of lipid peroxidation, oxidized proteins, oxidized cholesterol...). These breakdown products have a longer lifespan and some of them can cause gene activation or repression such as ATM, P53 (Valko et al. 2007).

Since it is essential to preserve enough ROS to ensure their function as secondary messengers, it is a major of to control their concentration in order to avoid an excess inside cells and tissues. In order to counteract ROS accumulation, cells possess defense systems constituted of non-enzymatic molecules (vitamin E, ascorbic acid, glutathione...) and enzymatic molecules (catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase...). Both of these systems play an essential role in protecting cells against radicals (Chaouni et al. 2020). Interestingly, Baluchamy *et al.* conducted a study on mouse brain that aimed at evaluating the state of oxidative stress induced by protons. They demonstrated that PT exerts an indirect effect which results in an increase in the expression of some genes that up-regulate ROS (Baluchamy et al. 2010).

Different other studies showed that exposure to radiations have an impact on oxidative stress in mouse intestine and colonic epithelial cells by functional dysregulation of mitochondria besides to an increase in oxidase activity (Datta et al. 2012) in addition to a loss of SOD and CAT activity (Suman et al. 2017). Moreover, *Chi et al.* demonstrated that X-ray irradiation induces an increase in lipid peroxidation and in ascorbyl radical in mouse skin (Chi et al. 2005). Kupper *et al.* showed that there is a protein oxidation in bone marrow, liver and lungs of C57BL/6J mice in response to irradiation (Barshishat-Kupper et al. 2014; 2015; Kim et al. 2014). Studying effects of radio-induced oxidative stress by targeting some biomarkers is necessary to understand different process leading to the development of some toxicities. The present study aimed at evaluating the response of healthy tissues (skin, lung, heart and blood) after scattered or scanned proton beam irradiation. For this purpose, C57Bl6 mice were total body irradiated either by DS or PBS at different proton doses in the plateau phase of the Spread-Out Bragg Peak (SOBP). Blood and organs were collected 3 months after irradiation. Survival of mice was evaluated, DNA damage were quantified by micronucleus assay and antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and protein carbonylation were assessed by biochemical techniques.

Materials & Methods

Reagents

RPMI and FBS were obtained from Lifesciences, NADPH from Roche (Mannheim, Germany), Legend plex™ and Human Inflammation Panel from BioLegend (San Diego, California, USA). All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA).

Animals and ethics considerations

Experiments were conducted on C57Bl6 mice in accordance with the European Council Directive 2010/63/UE on the protection and use of animals for scientific purpose. The study was approved by the research ethic committee. Mice were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). For this study, a number (n=24 per group) of 10 weeks-old male C57Bl6 mice, weighing 22-27g were housed at the RadeXP platform of Curie Institute, maintained in a 12h/12h light-dark cycle at 22°C with free access to food and water.

Irradiation

C57Bl6 mice were Total Body Irradiated (TBI) either by DS (Double Scattering) or PBS (Pencil Beam Scanning) at different proton doses (0, 6, 7.5, 10, 12 and 14 Gy) in the plateau phase of

the SOBP with an energy corresponding to 230 MeV. Irradiation was performed on C230 IBA accelerator at room temperature in the proton therapy center of Curie Institute. The dose rate used was the standard rate in conventional treatment: 2 Gy/min. Control mice were transported in the same conditions. Mice were anesthetized with 4% isoflurane before being placed under irradiator. Legs and tail were fixed with a soft plaster to prevent movements. Anesthesia (1.5-2% isoflurane) was kept in the mask throughout the irradiation. After irradiation, mice were housed in the animal house of the RadeXP platform and a veterinary follow-up was performed. Blood and organs were collected 3 months later.

Organ & blood sample collection

Three months after irradiation, animals were induced with 5% isoflurane and maintained under the mask with 1.5-2% isoflurane. Blood samples were collected by cardiac puncture and sent freshly to the laboratory. Then each organ of interest (heart, skin and lungs) was collected, stored at -80°C and sent to the laboratory.

Separation of blood components

Fresh collected blood samples were centrifuged at 1,000g during 10 min at room temperature then separated into 3 compartments: the first one was plasma samples which were frozen at -80°C and used for quantification of inflammatory cytokines, the second one was lymphocyte rings used for micronucleus assay and the last one was erythrocyte pellets aliquoted and frozen at -80°C for oxidative stress evaluation.

Cytochalasin-blocked micronucleus assay

Lymphocyte ring from each sample was put in 12 well plate containing RPMI 1640 culture medium (10% Fetal Bovine Serum or FCS, 1% penicillin/ streptomycine) supplemented with 2% of phytohemagglutinin (PHA). Plates were then incubated during 21 hours at 37°C, 5%CO₂ in humid atmosphere. After incubation, cytochalasin B was added to a final concentration of 3µg/ml in each culture well. After an additional 29 hours incubation, the content of each well was transferred to a FACS tubes, centrifuged at 180g during 5 min at room temperature. A volume of 2mL of cold 75 mM KCl solution was added to the pellet dropwise. Then, a solution of cold Acetic acid/MetOH solution was added. After centrifugation, the content of each pellet was spread on slides as described previously by Chaouni *et al.* (Chaouni et al. 2020). Analysis was performed using an automated scoring system Metafer (Metasystems, Altlußheim, Germany).

Preparation of erythrocytes lysates

Erythrocyte lysis was performed as described by Chaouni *et al.* (Chaouni et al. 2020). Briefly, Erythrocytes were placed in a lysis buffer and lysed by thermal shocks. Samples were then centrifuged and supernatants obtained were aliquoted and stored at -80°C .

Preparation of tissue homogenates

Collected tissues were placed in tubes on ice in the presence of phosphate buffer containing: KH_2PO_4 10 mM, Na_2HPO_4 40 mM, EDTA 0.1 M, pH=7.5 and were then homogenized using ULTRA-TURAX® (Staufen, Germany). Lung and heart homogenates were prepared following an increasing speed rate: 8,000, 9,500, 13,500, 20,500 rpm. Each step lasted 3 minutes. Concerning skin, the first step was set at 13,500 during 5 min followed by 5 min at 20,500 rpm and finally 5 min at 24,000 rpm. Homogenates were then centrifuged at 15,000 g during 10 min at 4°C . The supernatant obtained were aliquoted and stored at -80°C .

Protein quantification

The amount of proteins was determined using a Bradford assay. Briefly, 5 μL of diluted samples were added to 250 μL of Bradford reagent. A standard curve of BSA (Bovine Serum Albumine) was performed at the same time. Absorbance was measured at 595 nm using microplate reader (FLUOstar OPTIMA, BMG, Labtech). Protein concentrations were calculated according to the standard curve equation.

Measurement of superoxide dismutase activity

Total SOD activity was measured using the Flohé and Otting method (Flohé et Otting 1984). Briefly, erythrocyte lysates and tissue homogenates were diluted in bicarbonate buffer containing 50 mM NaHCO_3 , 50 mM Na_2CO_3 , 0.5 mM DTPA, 57.2 mM xanthine and 0.77 mM NBT (Nitrotetrazolium blue chloride). Samples were then placed in a 96-well plate. After an incubation at 30°C during 10 minutes, 20 μL of xanthine oxidase was added. SOD activity was monitored following the reduction of NBT measured by spectrophotometer (SYNERGY H1) at 560 nm every 15 sec during 1.5 min. One unit of SOD is defined as the amount of enzyme necessary for the disproportionation of 50% of the superoxide radicals. SOD activity was determined using the calculation below. Results were expressed in $\text{IU}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ of proteins.

$$\text{SOD activity} = (\% \text{ inhibition} \times 50) \div (\text{V}_{\text{tot}} \times \text{V}_{\text{s}})$$

V_{tot}: total volume, V_s: volume of diluted sample.

Measurement of catalase activity

Catalase activity was quantified as described by Chaoui *et al.* (Chaoui et al. 2020) in erythrocyte lysates and organ homogenates. Briefly, samples were diluted and reaction was initiated by the addition of hydrogen peroxide. The decrease in absorbance was measured by a microplate reader Synergie H1 (Biotech Labs, USA). Catalase activity was calculated according to standard curve and results were expressed as nmol of consumed hydrogen peroxide per min per mg of proteins.

Measurement of glutathione peroxidase activity

Glutathione peroxidase activity was quantified as described by Chaoui *et al.* (Chaoui et al. 2020) in erythrocyte lysates and organ homogenates. Briefly, samples were diluted in a buffer containing reduced glutathione and glutathione reductase and reaction was initiated by the addition of tert-butyl hydroperoxide. The decrease in absorbance was measured by a microplate reader Synergie H1 (Biotech Labs, USA). Glutathione activity was calculated according to the equation below curve and results were expressed as nmol of oxidized glutathione per min per mg of proteins.

$$\text{GPx activity} = 2 \times \frac{\frac{|\text{slope}| (\text{AU} \cdot \text{min}^{-1})}{\epsilon_{\text{NADPH}} (\text{cm}^{-1}) \times l (\text{cm})} \times \frac{\text{Vf} (\text{mL})}{\text{Vs} (\text{mL})} \times \text{sample dilution}}{\text{protein concentration (mg/mL)}}$$

AU: Absorbance Unit, ϵ : molar extinction coefficient for NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate) at 340 nm (0.00622 $\mu\text{m}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), l: optical path length, Vf: final volume per well, Vs: volume of diluted sample

Measurement of lipid peroxidation

Lipid peroxidation was evaluated as described by Chaoui *et al.* (Chaoui et al. 2020) in erythrocyte lysates and organ homogenates using PeroxiDetect Kit according to the manufacturer's recommendations. The amount of lipid hydroperoxides was measured by a microplate reader Synergie H1 (Biotech Labs, USA) and calculated from the standard curve of tert-Butyl Hydroperoxide (t-BuOOH). Results are expressed as nmol of peroxides per mg of proteins.

Measurement of protein carbonylation

Protein carbonylation was evaluated as described by Chaouni *et al.* (Chaouni et al. 2020) in erythrocyte lysates and organ homogenates using a protein carbonyl content assay kit according to the manufacturer's recommendations. The amount of protein carbonyls was measured by a microplate reader Synergie H1 (Biotech Labs, USA) and calculated from equation below. Results are expressed as nmol of protein carbonyls per mg of proteins.

$$\text{Protein carbonyls (nmol carbonyls/mg protein)} = (C/P) \times 1000 \times D$$

C: amount of carbonyls in sample wells (nmol/well), P: amount of proteins from standard wells, D: dilution factor of samples, 1000: conversion factor (μg to mg)

Cytokine quantification in plasma

A panel of 13 cytokines (IL-1 β , IFN- α 2, IFN- γ , TNF- α , MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-23, IL-33) was measured in plasma by using Legendplex™ Human Inflammation Panel as previously described by Chaouni *et al.* (Chaouni et al. 2020). Flow cytometry analysis was performed using a CytoFlex flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Data were analyzed using LEGENDplex™ version 8 data analysis software (BioLegend, San Diego, CA, USA).

Statistical analysis

Data are depicted as mean values \pm standard error of the mean (SEM). * for $p < 0.05$, ** for $p < 0.001$ and *** for $p < 0.0001$ for irradiated samples compared to non-irradiated ones and # for $p < 0.05$ and ## for $p < 0.005$ for DS compared to PBS (two-way ANOVA and Mann-Whitney test). Each experiment was performed in triplicates.

Results

Evaluation of survival of mice

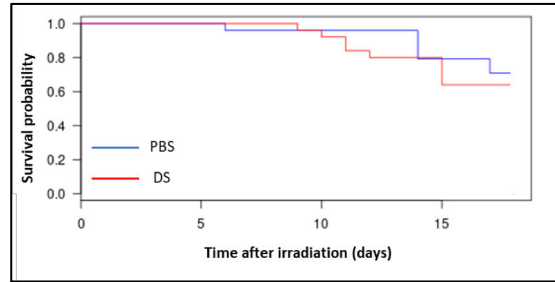


Figure 1. Survival of mice after 7.5 Gy proton TBI irradiation by PBS or DS. PBS: Pencil Beam Scanning, DS: Double Scattering. # for $p < 0.05$ and ## for $p < 0.005$ for DS compared to PBS.

Mouse survival curves showed significant decrease after irradiation at doses from 8 Gy (data not shown). Chosen irradiation dose for next experiments was the sublethal dose of 7.5 Gy. No significant difference was observed between the two types of proton delivery (Logrank test, $p=0.5542$, with $n=24$ for PBS and $n=25$ for DS).

Lymphocyte micronucleus frequency and distribution

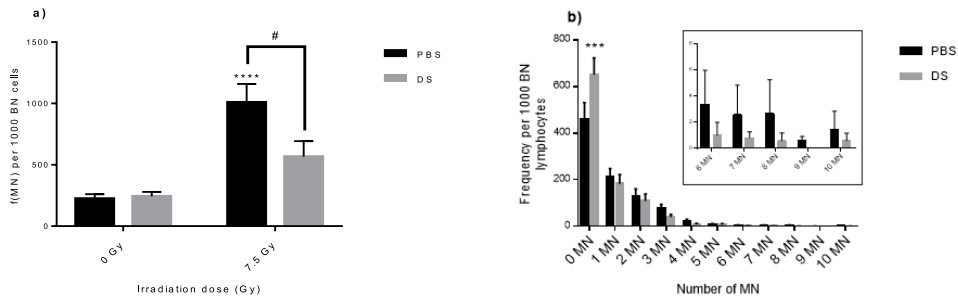


Figure 2. Lymphocyte micronucleus frequency (a) and distribution (b) at 7.5 Gy in the 2 irradiated groups. PBS: Pencil Beam Scanning, DS: Double Scattering. Data are depicted as mean values \pm standard error of the mean (SEM). * for $p < 0.05$, ** for $p < 0.001$ and *** for $p < 0.0001$ for irradiated samples compared to non-irradiated ones and # for $p < 0.05$ and ## for $p < 0.005$ for DS compared to PBS

In order to assess chromosome breaks and repairs induced by irradiation, we performed a CBMN assay to study genotoxicity (Figure 2). Our results showed that both irradiation delivery

techniques induced an increase in lymphocyte micronucleus frequency with a significant 4.3- and a non-significant 2.6-fold increase after PBS and after DS, respectively, in comparison to non-irradiated mice (Figure 2a). When comparing PBS and DS, there was a significant 1.6-fold increase in micronucleus frequency in PBS compared to DS irradiated mice. In addition, DS irradiation led to a higher level of undamaged lymphocytes whereas PBS irradiation seemed to induce a higher rate of strongly damaged lymphocytes in comparison to DS irradiation (Figure 2b).

Evaluation of antioxidant enzymes activities and oxidized glutathione in erythrocytes lysates and tissues homogenates

To evaluate the oxidative state in healthy tissues after irradiation, we analyzed the activity of the main 3 enzymes: SOD, CAT and GPx in addition to glutathione oxidized (GSSG) in erythrocytes lysate and collected organs (lung, heart and skin).

Concerning Superoxide Dismutase activity (Table 1), our results showed that, irradiation induces an increase in SOD activity in all collected samples, but significant only in lungs, from irradiated mice compared to non-irradiated ones, except in hearts from mice exposed to DS. This increase was significant in lungs in both groups. Regarding other organs, the same trend to increase was observed after DS irradiation with respectively 1.2-fold change after PBS vs 1.2-fold change after DS in erythrocytes lysates and 1.5-fold change after PBS irradiation vs 1.6-fold change after DS irradiation in skin samples. Concerning heart samples, the same trend to increase was observed after PBS irradiation however the contrary was observed after DS irradiation but this was not significant.

	Organ	Irradiation group				
		0 Gy	7,5 Gy PBS	% increase ↑ % decrease ↓	7,5 Gy DS	% increase ↑ % decrease ↓
Superoxide dismutase activity (U/mg of proteins)	Erythrocytes	27.29 ± 2.20	33.35 ± 2.53	22.2% ↑	33.68 ± 5.14	23.41% ↑
	Lung	58.51 ± 3.89	103.14 ± 14.81	76.27 % ↑ *	119.96 ± 23.00	105.02% ↑ **
	Heart	87.11 ± 8.07	96.59 ± 10.45	10.88 % ↑	61.00 ± 8.51	29.97 % ↓
	Skin	125.61 ± 13.61	192.46 ± 26.59	53.22% ↑	201.45 ± 27.46	60.37% ↑

Table 1. Superoxide dismutase activity in erythrocytes, lung, heart and skin of mice irradiated by PBS vs DS proton beams. PBS: Pencil Beam Scanning, DS: Double Scattering. Data are depicted as mean values ± standard error of the mean (SEM). * for p < 0.05, ** for p < 0.001 and *** for p < 0.0001 for irradiated samples compared to non-irradiated ones and # for p < 0.05 and ## for p < 0.005 for DS compared to PBS

Concerning glutathione peroxidase activity (Table 2), our results showed a significant increase in erythrocyte and skin homogenates after irradiation. There was a 1.3-fold higher GPx activity in erythrocyte lysates after PBS than after DS. There was a same trend in other organs to more

GPx activity after PBS than after DS: 1.1-fold and 1.3-fold higher GPx activity in lungs and in skin, respectively. However, the contrary was observed in heart samples with a 0.82-fold change after PBS vs DS irradiation.

	Organ	Irradiation group				
		0 Gy	7,5 Gy PBS	% increase ↑ % decrease ↓	7,5 Gy DS	% increase ↑ % decrease ↓
Glutathione peroxidase (nmol of oxidized glutathione/mg in/mg proteins)	Erythrocytes	178.46 ± 5.66	261.73 ± 13.49	46.66% ↑***	204.06 ± 12.13	14.34 % ↑###
	Lung	1404.86 ± 118.57	1755.60 ± 224.37	24.96 % ↑	1574.60 ± 111.07	12.08 % ↑
	Heart	699.81 ± 60.83	721.15 ± 56.02	3.04 % ↑	878.41 ± 76.2	25.52 % ↑
	Skin	120.41 ± 16.24	194.12 ± 23.85	61.21 % ↑*	146.32 ± 4.16	21.51 % ↑

Table 2. Glutathione peroxidase activity in erythrocytes, lung, heart and skin of mice irradiated by PBS vs DS proton beams. PBS: Pencil Beam Scanning, DS: Double Scattering. Data are depicted as mean values ± standard error of the mean (SEM). * for p < 0.05, ** for p < 0.001 and *** for p < 0.0001 for irradiated samples compared to non-irradiated ones and # for p < 0.05 and ## for p < 0.005 for DS compared to PBS

Catalase activity (Table 3) was globally increased after irradiation, but significantly only for erythrocytes with PBS mode. In heart samples, CAT activity seemed to be unchanged after DS and even decreased after PBS. When comparing PBS and DS irradiation, there were no significant variations. A non-significant strong increase can be noted concerning lung CAT activity with a 1.6-fold higher value after DS compared to PBS. However, it should be mentioned that CAT activity values for heart and lungs were very low making interpretation quite difficult.

	Organ	Irradiation group				
		0 Gy	7,5 Gy PBS	% increase ↑ % decrease ↓	7,5 Gy DS	% increase ↑ % decrease ↓
Catalase (U/mg proteins)	Erythrocytes	3.50 ± 0.15	4.44 ± 0.36	25.42 % ↑***	3.07 ± 0.13	12.28 % ↑
	Skin	2.79 ± 0.35	3.62 ± 0.40	29.74 % ↑	3.63 ± 0.65	30.10 % ↑
	Heart	0.12 ± 0.01	0.09 ± 0.002	25.00 % ↓	0.12 ± 0.003	No change
	Lung	0.24 ± 0.04	0.25 ± 0.05	4.16 % ↑	0.40 ± 0.07	66.66 % ↑

Table 3. Catalase activity in erythrocytes, lung, heart and skin of mice irradiated by PBS vs DS proton beams. PBS: Pencil Beam Scanning, DS: Double Scattering. Data are depicted as mean values ± standard error of the mean (SEM). * for p < 0.05, ** for p < 0.001 and *** for p < 0.0001 for irradiated samples compared to non-irradiated ones and # for p < 0.05 and ## for p < 0.005 for DS compared to PBS

Finally, results concerning oxidized glutathione (Table 4) showed a high significant increase in GSSG level in lungs and heart after PBS irradiation and in skin after PBS irradiation. There were significant changes in GSSG between PBS and DS irradiation. On one hand, there was one on a 1.5-fold increase in heart samples after PBS compared to DS. On the other hand, there was a significant 1.6-fold increase in skin samples after DS compared to PBS.

	Organ	Irradiation group				
		0 Gy	7,5 Gy PBS	% increase ↑ % decrease ↓	7,5 Gy DS	% increase ↑ % decrease ↓
Oxidized glutathione (μmol/ g of protein)	Erythrocytes	12.98 ± 0.42	12.45 ± 1.13	4.08 % ↓	13.35 ± 1.33	2.85 % ↑
	Lung	9.18 ± 0.95	16.63 ± 2.95	81.15 % ↑ **	13.28 ± 1.63	44.66 % ↑
	Heart	9.80 ± 1.04	18.96 ± 1.84	93.46 % ↑ ***	12.68 ± 1.90	29.38 % ↑ #
	Skin	8.64 ± 0.74	8.99 ± 0.92	4.05 % ↑	14.22 ± 2.73	7.03 % ↑ *** #

Table 4. Oxidized glutathione (GSSG) in erythrocytes, lung, heart and skin of mice irradiated by PBS vs DS proton beams. PBS: Pencil Beam Scanning, DS: Double Scattering. Data are depicted as mean values ± standard error of the mean (SEM). * for p < 0.05, ** for p < 0.001 and *** for p < 0.0001 for irradiated samples compared to non-irradiated ones and # for p < 0.05 and ## for p < 0.005 for DS compared to PBS

Lipid peroxidation in erythrocytes lysates and tissue homogenates

Lipid peroxidation was quantified in order to assess the oxidative state of lipids. Our results showed (Table 5) a significant increase in LPO rate with PBS irradiation compared to controls in erythrocytes lysates. The same trend to increase was observed in lung but was significant only after. For all samples, no remarkable variations were observed between PBS vs DS. However, trends were observed with a higher LPO content in erythrocyte lysates and heart homogenates after PBS than after DS whereas the contrary was observed in lungs. Concerning skin samples, LPO level was below the detection threshold.

	Organ	Irradiation group				
		0 Gy	7,5 Gy PBS	% increase ↑ % decrease ↓	7,5 Gy DS	% increase ↑ % decrease ↓
Lipid peroxidation (nmol/ mg of protein)	Erythrocytes	57.12 ± 4.46	89.93 ± 9.63	57.44 % ↑ ***	68.76 ± 5.35	20.37 % ↑
	Lung	11.87 ± 1.43	16.12 ± 2.36	35.80 % ↑	21.82 ± 3.77	83.82 % ↑ **
	Heart	18.87 ± 1.26	22.74 ± 5.84	20.50 % ↑	21.21 ± 0.91	12.40 % ↑
	Skin	LPO level below detection limit				

Table 5. Lipid peroxidation in erythrocytes, lung, heart and skin of mice irradiated by PBS vs DS proton beams. PBS: Pencil Beam Scanning, DS: Double Scattering. Data are depicted as mean values ± standard error of the mean (SEM). * for p < 0.05, ** for p < 0.001 and *** for p < 0.0001 for irradiated samples compared to non-irradiated ones and # for p < 0.05 and ## for p < 0.005 for DS compared to PBS

Protein carbonylation in erythrocytes lysates and tissue homogenates

Protein carbonylation was measured (Table 6) and revealed a significant increase in carbonyl level in erythrocytes lysates after PBS or DS irradiation. No significant changes were observed between both types of proton delivery. However, there was a trend to a lower carbonyl level after DS than after PBS irradiation. Concerning skin samples, carbonyl level was below the detection threshold.

Organ	Irradiation group				
	0 Gy	7,5 Gy PBS	% increase ↑ % decrease ↓	7,5 Gy DS	% increase ↑ % decrease ↓
Carbonyls (nmol carbonyl/mg of protein)					
Erythrocytes	202.62 ± 5.72	273.36 ± 8.58	34.91 % ↑ ***	234.85 ± 7.06	15.90 % ↑ *
Lung	11.92 ± 0.93	11.25 ± 1.46	5.62 % ↑	10.73 ± 1.08	9.98 % ↓
Heart	7.04 ± 0.47	7.35 ± 1.04	4.40 % ↑	6.53 ± 0.88	7.24 % ↓
Lung	Carbonyl level below detection limit				

Table 6. Carbonyls in erythrocytes, lung, heart and skin of mice irradiated by PBS vs DS proton beams. PBS: Pencil Beam Scanning, DS: Double Scattering. Data are depicted as mean values ± standard error of the mean (SEM). * for $p < 0.05$, ** for $p < 0.001$ and *** for $p < 0.0001$ for irradiated samples compared to non-irradiated ones and # for $p < 0.05$ and ## for $p < 0.005$ for DS compared to PBS

Quantification of plasma inflammatory cytokines

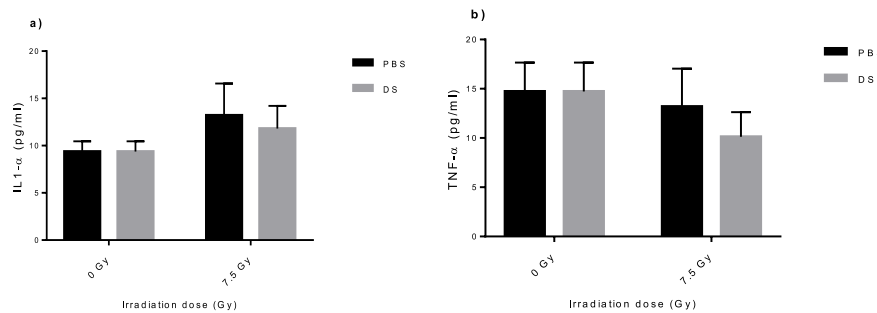


Figure 3. IL-1 α (Interleukin 1) (a) and TNF- α (Tumor Necrosis Factor α) (b) concentration in plasma's in both groups of mice. PBS: Pencil Beam Scanning, DS: Double Scattering. Data are depicted as mean values ± standard error of the mean (SEM).

After measurement of 14 cytokines level in plasma samples, our results showed that irradiation induced a non-significant increase in IL-1 α level with a 1.4- and a 1.3-fold increase after PBS and DS, respectively, compared to unirradiated samples (Figure 2a). In contrast, a non-significant decrease of TNF- α level was observed for both groups with a 1.1- and a 1.5-fold decrease after PBS and DS, respectively, compared to unirradiated samples (Figure 2b). Concerning MCP-1 and IL-1 β , no differences were observed after irradiation (data not shown). The levels of IL-1/6/10/12p70/17A/23/33 and IFN- γ 2/y were below the detection threshold (data not shown).

Discussion

Few data on side effects of protontherapy are available and they are not sufficient to answer to many questions related to the biological effects of proton exposure on healthy tissues. Moreover, proton delivery can be performed by two different techniques, passive or active, leading to differences in terms of dose, but also dose rate and fractionation. The present study aimed at evaluating normal tissue response (blood, lung, heart and skin) 3 months after TBI either by PBS (Pencil Beam Scanning) or DS (Double Scattering) in C57Bl6 mouse model.

First of all, survival of mice was assessed and allowed to choose the sublethal dose of 7.5 Gy for next assays. At this dose, there was no significant difference between survival curves after PBS or after DS delivery (Figure 1).

CBMN assay allowed to evaluate DNA damage following exposure to radiations. Our results showed that whole body proton irradiation induced a high lymphocyte micronucleus frequency (Figure 2a). Chang *et al.* also demonstrated that whole body proton irradiation of C57BL/6J mice led to an increase in DNA damage in hematopoietic stem cells (Chang *et al.* 2015). Previous studies have also shown an increase in DNA damage after X-ray TBI exposure of C57Bl6 mice with an increased expression of p-H2AX (Xue *et al.* 2017; Chang *et al.* 2019). In our study, micronucleus frequency was significantly higher in PBS than in DS irradiated mice. This observation can be correlated to the stronger rate of highly damaged lymphocytes in PBS than in DS irradiated mice (Figure 2b). This result suggests that PBS irradiation leads to more residual damage on lymphocytes in comparison to DS. This is in agreement with the study performed by Michaelidesova *et al.* on normal human cells (fibroblasts, medulloblastoma cell line) showing that PBS proton beam delivery was more efficient to produce double-strand breaks (Michaelidesová *et al.* 2016). It could be interesting to evaluate *in vitro* the ability of both delivery modes to induce long term genotoxicity in primary normal cells.

One of the most known mechanisms of radiation effect is to cause an imbalance in redox homeostasis by the production of ROS thus generating an oxidative stress. To restore cell homeostasis, different molecules involved in the antioxidant defenses are activated to avoid ROS accumulation (Baluchamy *et al.* 2010). SOD, CAT, GPx and GSSG are molecules at the front line in the detoxification chain. It is of major importance to measure their level in order to evaluate the antioxidant capacity in erythrocyte lysates and organ homogenates. Our results concerning antioxidant activities are changing according to the radiation dose and the organ. The most relevant variations after irradiation compared to unirradiated mice were an increase in SOD activity in lungs (Table 1), in GPx activity in erythrocytes and skin (Table 2), in CAT activity in erythrocytes (Table 3) and in GSSG level in lungs, heart and skin (Table 4). In the same way, previous studies concerning total-body proton irradiation of mice led to a differential

modulation of oxidative stress gene expression in liver with an early increase in Prdx6 and Sod3, mainly, whereas other genes were common to photon irradiation (Gridley et al. 2011) and to a late increase in ROS production and NOX4 transcription in hematopoietic stem cells from irradiated mice (Chang et al. 2015). Liao *et al.* have also shown that proton irradiation induces an overexpression of CAT which has a neuroprotective effect on hippocampal cell proliferation (Liao et al. 2013). On the other hand, when regarding higher LET radiations, Datta *et al.* have shown that there was a decrease in SOD activity in mouse intestine exposed to ⁵⁶Fe. Contrary to results observed after proton TBI, 5 months after X-ray whole thorax C57Bl6 irradiation, Pan *et al.* observed a significant decrease in SOD, CAT and GPx activities (Pan et al. 2012). However, results are contradictory with X-rays as other studies demonstrated that there is an increase in CAT activity in chicken tissues: kidney, brain, muscle, and liver (Foceca et al. 2012), an increase in SOD activity but a decrease in GPx in TBI irradiated C3H/HeN mice (Park et al. 2007). ROS were also shown to increase in lungs after X-ray TBI (Chang et al. 2019). When looking at the differences between PBS and DS techniques, the only significant changes that were observed were a decrease in GPx activity in erythrocytes and in GSSG level in heart after DS compared to PBS whereas an increase in GSSG level was observed after DS compared to PBS in skin. Globally, GPx activity is higher after PBS than after DS. It would be interesting to assess glutathione reductase activity which is part of the cycle regenerating GSSG into GSH. These results tend to show that active scanning and passive delivery result in completely different profiles of antioxidant capacity.

In order to evaluate damage to lipids and proteins, lipid peroxidation and protein carbonylation were measured. After irradiation, the level of lipid hydroperoxides was significantly increased in erythrocytes of mice exposed to PBS and in lungs of mice exposed to DS compared to unirradiated samples (Table 5). Baluchamy *et al.* have also shown an increase in lipid peroxidation in mouse brain after proton irradiation (Baluchamy et al. 2012). In the same way, after photon irradiation, Iizawa *et al.* have shown an increase in LPO level in skin homogenates of C57BL/6 mice 18h post irradiation (Iizawa et al. 1994). This was confirmed by Chi *et al.* after a high dose of X-rays (Chi et al. 2005). Regarding the difference between PBS and DS, no significant changes were observed in LPO in the different organs. Concerning protein carbonyls, their level was significantly increased in erythrocytes whatever the proton delivery technique (Table 6). Barshishat-Kupper *et al.* used mass spectrometry technic and identified 7 carbonylated proteins in C57Bl/6J lung samples 24h post thoracic photon irradiation (Barshishat-Kupper et al. 2015). In addition, carbonylation of four proteins were increased in bone marrow of C57Bl/6J mice exposed to 7.5Gy ⁶⁰Co total body irradiation (Kim et al. 2014).

As for LPO, protein carbonylation was not significantly changed between both proton delivery modes. However, a trend to a higher level of carbonyls was observed after PBS compared to DS. In this way, active scanning seems to lead to higher damage to macromolecules and higher antioxidant capacity depending on the organ considered. For LPO and protein carbonylation, the use of more sensitive techniques would be interesting as well as the measurement of adducts to DNA. Indeed, MDA is a well-known lipid peroxidation product and can react with 2'-deoxyguanosine, 2'-deoxyadenosine, and 2'-deoxycytidine (for review, (Cadet et al. 2017)). These adducts can be measured by ultra-high performance liquid chromatography-electrospray ionization analytical method coupled to mass spectrometry in the tandem mode (Alamil et al. 2020). In the same manner, identification of specific proteins being carbonylated after proton irradiation should be interesting by using an OxyBlot Oxidized Protein Detection Kit (Millipore) (Barshishat-Kupper et al. 2015).

Inflammatory cytokine IL-1 α was not significantly increased after proton irradiation (Figure 3a). Surprisingly, TNF- α was decreased after proton irradiation (Figure 3b), even if not significantly. Indeed, inflammatory cytokines were already shown to increase in mouse skin after irradiation (Okunieff et al. 2006). However, Budagov *et al.* did not see differences in plasmatic inflammatory cytokines in irradiated mice (Budagov et Ulianova 2000). Moreover, Warren et Moore showed that TNF administration in mice could protect hematopoietic stem cells from radiation effects, which was not the case with IL-1 administration (Warren, Slørdal, et Moore 1990). Therefore, the trend to a decrease in TNF- α and to an increase in IL-1 α after proton irradiation could demonstrate that PT leads to toxicities, even 3 months after irradiation. Concerning the different techniques of proton delivery, a same trend was observed in our experiments for both cytokines: PBS led to a higher level than DS proton delivery. Gridley *et al.* measured TNF- α in supernatants of human lung epithelial cells exposed either to active or passive proton beams but could not detect it, even in supernatants of unirradiated cells (Gridley et al. 2015).

In summary, our findings indicate that proton radiation exposure has an effect on antioxidant enzymes activities, glutathione level and lipid and protein oxidation even long time after irradiation. This suggests that the oxidative state remains changed long time after irradiation coming from either from the irradiation itself or from waves of oxidative stress resulting, for example, from inflammatory phenomena. Concerning the two types of proton delivery, our results let us hypothesize that PBS, even if survival of mice was the same as for DS, leads to different response according to the organs considered in terms of genotoxicity, antioxidant capacity, lipid peroxidation, protein carbonylation and inflammatory cytokines. In general, PBS

led to trends to an increase in micronucleus frequency, in GPx activity, in protein carbonyls and in IL-1 α and TNF- α .

Conclusion

Few studies have been carried out on side effects of protontherapy. In addition, few scientific projects have looked at the comparison of effects of the difference in dose delivery to healthy tissues by the two types of beams used in protontherapy: scanned and scattered. These side effects could be linked to oxidative phenomena occurring after exposure to ionizing radiations. The response of lungs and heart in terms of long-term oxidative stress is an essential path that needs to be explored because these organs are considered as OAR, especially in the case of breast cancer treatment with proton therapy (MacDonald et al. 2013) and skin is also crucial organ as its adverse effects are the most common after breast cancer RT: more than 50% for acute and up to 50 % for late side effects (Shapiro et Recht 2001). The aim of this study was to assess the relative toxicity of the two modes of proton delivery PBS *vs* DS on healthy tissues. Our different findings allowed us to obtain some responses about the toxic effects of PT by the identification of some specific biomarkers. Moreover, this study pointed out the necessity to take into account the specificity of dose delivery but also of each healthy tissue crossed by the beams.

References

- Alamil, Hélène, Laurence Galanti, Natacha Heutte, Marie Van Der Schueren, Zeina Dagher, et Mathilde Lechevrel. 2020. « Genotoxicity of Aldehyde Mixtures: Profile of Exocyclic DNA-Adducts as a Biomarker of Exposure to Tobacco Smoke ». *Toxicology Letters* 331 (octobre): 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.05.010>.
- Azzam, Edouard I., Jean-Paul Jay-Gerin, et Debkumar Pain. 2012. « Ionizing Radiation-Induced Metabolic Oxidative Stress and Prolonged Cell Injury ». *Cancer Letters* 327 (1-2): 48-60. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.12.012>.
- Baluchamy, Prabakaran Ravichandran, Vani Ramesh, Zhenhua He, Ye Zhang, Joseph C. Hall, Olufisayo Jejelowo, Daila S. Gridley, Honglu Wu, et Govindarajan T. Ramesh. 2012. « Reactive Oxygen Species Mediated Tissue Damage in High Energy Proton Irradiated Mouse Brain ». *Molecular and Cellular Biochemistry* 360 (1-2): 189-95. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-1056-2>.
- Baluchamy, Sudhakar, Ye Zhang, Prabakaran Ravichandran, Vani Ramesh, Ayodotun Sodipe, Joseph C. Hall, Olufisayo Jejelowo, Daila S. Gridley, Honglu Wu, et Govindarajan T. Ramesh. 2010. « Differential Oxidative Stress Gene Expression Profile in Mouse Brain after Proton Exposure ». *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal* 46 (8): 718-25. <https://doi.org/10.1007/s11626-010-9330-2>.
- Barker, Holly E., James T. E. Paget, Aadil A. Khan, et Kevin J. Harrington. 2015. « The Tumour Microenvironment after Radiotherapy: Mechanisms of Resistance and Recurrence ». *Nature Reviews. Cancer* 15 (7): 409-25. <https://doi.org/10.1038/nrc3958>.
- Barshishat-Kupper, Michal, Elizabeth A. McCart, James G. Freedy, Ashlee J. Tipton, Vitaly Nagy, Sung-Yop Kim, Michael R. Landauer, Gregory P. Mueller, et Regina M. Day. 2015. « Protein Oxidation in the Lungs of C57BL/6J Mice Following X-Irradiation ». *Proteomes* 3 (3): 249-65. <https://doi.org/10.3390/proteomes3030249>.
- Barshishat-Kupper, Michal, Ashlee J. Tipton, Elizabeth A. McCart, Jeffrey McCue, Gregory P. Mueller, et Regina M. Day. 2014. « Effect of Ionizing Radiation on Liver Protein Oxidation and Metabolic Function in C57BL/6J Mice ». *International Journal of Radiation Biology* 90 (12): 1169-78. <https://doi.org/10.3109/09553002.2014.930536>.
- Baskar, R., K. Lee, R. Yeo, et K.W. Yeoh. 2012. « Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions ». *International Journal of Medical Sciences* 9: 193-99. <https://doi.org/10.7150/ijms.3635>.
- Björk-Eriksson, Thomas, et Bengt Glimelius. 2005. « The Potential of Proton Beam Radiation Therapy in Breast Cancer ». *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)* 44 (8): 884-89. <https://doi.org/10.1080/02841860500355918>.
- Brown, J. M. 2000. « Exploiting the Hypoxic Cancer Cell: Mechanisms and Therapeutic Strategies ». *Molecular Medicine Today* 6 (4): 157-62. [https://doi.org/10.1016/s1357-4310\(00\)01677-4](https://doi.org/10.1016/s1357-4310(00)01677-4).
- Budagov, R. S., et L. P. Ul'ianova. 2000. « Comparative analysis of proinflammatory cytokines in plasma of mice exposed to radiation or in combined radiation injury ». *Radiatsionnaia*

Biologia, Radioecologia 40 (2): 188-91.

Cadet, Jean, Kelvin J. A. Davies, Marisa Hg Medeiros, Paolo Di Mascio, et J. Richard Wagner. 2017. « Formation and Repair of Oxidatively Generated Damage in Cellular DNA ». *Free Radical Biology & Medicine* 107: 13-34. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.049>.

Calugaru, Valentin. 2011. « Efficacité biologique relative (EBR) des faisceaux de protons utilisés en radiothérapie ». Phdthesis, Université Paris Sud - Paris XI. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00769946/document>.

Chang, Wei Feng, Yingying Wang, Yi Luo, Antiño R. Allen, Igor Koturbash, Jennifer Turner, et al. 2015. « Whole-Body Proton Irradiation Causes Long-Term Damage to Hematopoietic Stem Cells in Mice ». *Radiation research* 183 (2): 240-48. <https://doi.org/10.1667/RR13887.1>.

Chang, Shimin, Liang Hu, Yipu Xu, Xiangchun Li, Linsha Ma, Xiaoyu Feng, Jingsong Wang, Chunmei Zhang, et Songlin Wang. 2019. « Inorganic Nitrate Alleviates Total Body Irradiation-Induced Systemic Damage by Decreasing Reactive Oxygen Species Levels ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 103 (4): 945-57. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2018.11.021>.

Chaouni, Samia, Delphine Dumont Lecomte, Dinu Stefan, Alexandre Leduc, Victor Barraux, Alexandra Leconte, Jean-Michel Grellard, et al. 2020. « The Possibility of Using Genotoxicity, Oxidative Stress and Inflammation Blood Biomarkers to Predict the Occurrence of Late Cutaneous Side Effects after Radiotherapy ». *Antioxidants* 9 (3): 220. <https://doi.org/10.3390/antiox9030220>.

Chi, Cuiping, Ryoko Tanaka, Yohei Okuda, Nobuo Ikota, Haruhiko Yamamoto, Shiro Urano, Toshihiko Ozawa, et Kazunori Anzai. 2005. « Quantitative Measurements of Oxidative Stress in Mouse Skin Induced by X-Ray Irradiation ». *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 53 (11): 1411-15. <https://doi.org/10.1248/cpb.53.1411>.

Choi, Changhoon, Chansu Lee, Sung-Won Shin, Shin-Yeong Kim, Sung Noh Hong, et Hee Chul Park. 2019. « Comparison of Proton and Photon Beam Irradiation in Radiation-Induced Intestinal Injury Using a Mouse Model ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (8). <https://doi.org/10.3390/ijms20081894>.

Cleary, S. F., W. J. Geeraets, R. C. Williams, H. A. Mueller, et W. T. Ham. 1972. « X-Ray and Proton Induced Lens Changes in the Rabbit ». *Health Physics* 23 (4): 453-59. <https://doi.org/10.1097/00004032-197210000-00001>.

———. 1973. « Lens Changes in the Rabbit from Fractionated X-Ray and Proton Irradiations ». *Health Physics* 24 (3): 269-76. <https://doi.org/10.1097/00004032-197303000-00001>.

Datta, Kamal, Shubhankar Suman, Bhaskar V. S. Kallakury, et Albert J. Fornace. 2012. « Exposure to Heavy Ion Radiation Induces Persistent Oxidative Stress in Mouse Intestine ». *PLoS One* 7 (8): e42224. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042224>.

De Marzi, Ludovic. 2016. « Effets physiques et biologiques des faisceaux de protons balayés : mesures et modélisation pour des balayages séquentiels à haut débit ». Theses, Université Paris

Saclay (COMUE). <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01447662>.

Doyen, J., P. -Y. Bondiau, K. Benezery, J. Thariat, M. Vidal, A. Gérard, J. Hérault, C. Carrie, et J. -M. Hannoun-Lévi. 2016. « Indications et résultats de la protonthérapie dans le traitement des cancers ». *Cancer/Radiothérapie*, 27e Congrès national de la Société française de radiothérapie oncologique, 20 (6): 513-18. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2016.06.005>.

Emami, B., J. Lyman, A. Brown, L. Coia, M. Goitein, J.E. Munzenrider, B. Shank, L.J. Solin, et M. Wesson. 1991. « Tolerance of Normal Tissue to Therapeutic Irradiation ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 21: 109-22. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(91\)90171-y](https://doi.org/10.1016/0360-3016(91)90171-y).

Flohé, L., et F. Otting. 1984. « Superoxide Dismutase Assays ». *Methods in Enzymology* 105: 93-104. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05013-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05013-8).

Focsa, R., C. Nadejde, D. Creanga, et T. Luchian. 2012. « Low Dose X –Ray Effects on Catalase Activity in Animal Tissue ». *Journal of Physics: Conference Series* 398 (1): 012032. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/398/1/012032>.

Girdhani, Swati, Clare Lamont, Philip Hahnfeldt, Amir Abdollahi, et Lynn Hlatky. 2012. « Proton Irradiation Suppresses Angiogenic Genes and Impairs Cell Invasion and Tumor Growth ». *Radiation Research* 178 (1): 33-45.

Girdhani, Swati, Rainer Sachs, et Lynn Hlatky. 2013. « Biological Effects of Proton Radiation: What We Know and Don't Know ». *Radiation Research* 179 (3): 257-72. <https://doi.org/10.1667/RR2839.1>.

Gridley, T. L. Freeman, A. Y. Makinde, A. J. Wroe, X. Luo-Owen, J. Tian, X. W. Mao, et al. 2011. « Comparison of Proton and Electron Radiation Effects on Biological Responses in Liver, Spleen and Blood ». *Int J Radiat Biol* 87 (12): 1173-81. <https://doi.org/10.3109/09553002.2011.624393>.

Gridley, Michael J. Pecaut, Xiao W. Mao, Andrew J. Wroe, et Xian Luo-Owen. 2015. « Biological Effects of Passive versus Active Scanning Proton Beams on Human Lung Epithelial Cells ». *Technology in Cancer Research & Treatment* 14 (1): 81-98. <https://doi.org/10.7785/tcrt.2012.500392>.

Grutters, Janneke P. C., Alfons G. H. Kessels, Madelon Pijls-Johannesma, Dirk De Ruyscher, Manuela A. Joore, et Philippe Lambin. 2010. « Comparison of the Effectiveness of Radiotherapy with Photons, Protons and Carbon-Ions for Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis ». *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 95 (1): 32-40. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2009.08.003>.

Hall, Eric J. 2006. « Intensity-Modulated Radiation Therapy, Protons, and the Risk of Second Cancers ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 65 (1): 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2006.01.027>.

Iizawa, O., T. Kato, H. Tagami, H. Akamatsu, et Y. Niwa. 1994. « Long-Term Follow-up Study of Changes in Lipid Peroxide Levels and the Activity of Superoxide Dismutase, Catalase and

Glutathione Peroxidase in Mouse Skin after Acute and Chronic UV Irradiation ». *Archives of Dermatological Research* 286 (1): 47-52. <https://doi.org/10.1007/BF00375843>.

Ikwegbue, Paul Chukwudi, Priscilla Masamba, Babatunji Emmanuel Oyinloye, et Abidemi Paul Kappo. 2017. « Roles of Heat Shock Proteins in Apoptosis, Oxidative Stress, Human Inflammatory Diseases, and Cancer ». *Pharmaceuticals* 11 (1). <https://doi.org/10.3390/ph11010002>.

Ilicic, K., S. E. Combs, et T. E. Schmid. 2018. « New insights in the relative radiobiological effectiveness of proton irradiation ». *Radiation Oncology (London, England)* 13 (janvier). <https://doi.org/10.1186/s13014-018-0954-9>.

Johansson, Bengt, Mona Ridderheim, et Bengt Glimelius. 2005. « The Potential of Proton Beam Radiation Therapy in Prostate Cancer, Other Urological Cancers and Gynaecological Cancers ». *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)* 44 (8): 890-95. <https://doi.org/10.1080/02841860500355942>.

Kim, Yong-Chul, Michal Barshishat-Kupper, Elizabeth A. McCart, Gregory P. Mueller, et Regina M. Day. 2014. « Bone Marrow Protein Oxidation in Response to Ionizing Radiation in C57BL/6J Mice ». *Proteomes* 2 (3): 291-302. <https://doi.org/10.3390/proteomes2030291>.
Laurent. 2018. « Oxidative Stress in Hadrontherapy ». *Novel Prospects in Oxidative and Nitrosative Stress*, mai. <https://doi.org/10.5772/intechopen.73238>.

Liao, A. C., B. M. Craver, B. P. Tseng, K. K. Tran, V. K. Parihar, M. M. Acharya, et C. L. Limoli. 2013. « Mitochondrial-Targeted Human Catalase Affords Neuroprotection from Proton Irradiation ». *Radiat Res* 180 (1): 1-6. <https://doi.org/10.1667/RR3339.1>.

Loeffler, Jay S., et Marco Durante. 2013. « Charged Particle Therapy—Optimization, Challenges and Future Directions ». *Nature Reviews. Clinical Oncology* 10 (7): 411-24. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.79>.

Lomax, A. J. 2008. « Intensity Modulated Proton Therapy and Its Sensitivity to Treatment Uncertainties 1: The Potential Effects of Computational Uncertainties ». *Physics in Medicine and Biology* 53 (4): 1027-42. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/53/4/014>.

Lundkvist, Jonas, Mattias Ekman, Suzanne Rehn Ericsson, Bengt Jönsson, et Bengt Glimelius. 2005. « Cost-Effectiveness of Proton Radiation in the Treatment of Childhood Medulloblastoma ». *Cancer* 103 (4): 793-801. <https://doi.org/10.1002/cncr.20844>.

MacDonald, Shannon M., Rachel Jimenez, Peter Paetzold, Judith Adams, Jonathan Beatty, Thomas F. DeLaney, Hanne Kooy, Alphonse G. Taghian, et Hsiao-Ming Lu. 2013. « Proton Radiotherapy for Chest Wall and Regional Lymphatic Radiation; Dose Comparisons and Treatment Delivery ». *Radiation Oncology (London, England)* 8 (mars): 71. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-8-71>.

Marrocco, I., F. Altieri, et I. Peluso. 2017. « Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2017/6501046>.

Matsubara, Hiroaki, Kumiko Karasawa, Wataru Furuichi, Mitsuji Wakaisami, Shintaro Shiba,

Masaru Wakatsuki, Tokuhiko Omatsu, Taku Inaniwa, Shigekazu Fukuda, et Tadashi Kamada. 2018. « Comparison of passive and scanning irradiation methods for carbon-ion radiotherapy for breast cancer ». *Journal of Radiation Research* 59 (5): 625-31. <https://doi.org/10.1093/jrr/rry052>.

Michaelidesová, Anna, Jana Koniřová, Jana Vachelová, Vladimír Vondráček, et Marie Davidková. 2016. « Nowadays Proton Therapy: Double Scattering versus Pencil Beam Scanning Mode ». *Physica Medica*, Abstracts from the 1st European Congress of Medical Physics, 32 (septembre): 309-10. <https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2016.07.174>.

Mishra, Rahul Khairnar, Søren M. Bentzen, Gary Larson, Henry Tsai, Christopher Sinesi, Carlos Vargas, et al. 2019. « Proton beam therapy delivered using pencil beam scanning vs. passive scattering/uniform scanning for localized prostate cancer: Comparative toxicity analysis of PCG 001-09 ». *Clinical and Translational Radiation Oncology* 19 (août): 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.ctro.2019.08.006>.

Miyawaki, Daisuke, Masao Murakami, Yusuke Demizu, Ryohei Sasaki, Yasue Niwa, Kazuki Terashima, Hideki Nishimura, Yoshio Hishikawa, et Kazuro Sugimura. 2009. « Brain Injury after Proton Therapy or Carbon Ion Therapy for Head-and-Neck Cancer and Skull Base Tumors ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 75 (2): 378-84. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2008.12.092>.

Mohan, Radhe, et David Grosshans. 2017. « Proton Therapy - Present and Future ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 109 (janvier): 26-44. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.11.006>.

Okunieff, Paul, Jianhua Xu, Dongping Hu, Weimin Liu, Lurong Zhang, Gary Morrow, Alice Pentland, Julie L. Ryan, et Ivan Ding. 2006. « Curcumin Protects against Radiation-Induced Acute and Chronic Cutaneous Toxicity in Mice and Decreases MRNA Expression of Inflammatory and Fibrogenic Cytokines ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 65 (3): 890-98. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2006.03.025>.

Paganetti. 2002. « Nuclear Interactions in Proton Therapy: Dose and Relative Biological Effect Distributions Originating from Primary and Secondary Particles ». *Physics in Medicine and Biology* 47 (5): 747-64.

———. 2014. « Relative Biological Effectiveness (RBE) Values for Proton Beam Therapy. Variations as a Function of Biological Endpoint, Dose, and Linear Energy Transfer ». *Physics in Medicine and Biology* 59 (22): R419-472. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/59/22/R419>.

Pan, Jianru, Ying Su, Xiaojun Hou, Huocong He, Shutao Liu, Junxin Wu, et Pingfan Rao. 2012. « Protective Effect of Recombinant Protein SOD-TAT on Radiation-Induced Lung Injury in Mice ». *Life Sciences* 91 (3-4): 89-93. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.06.003>.

Park, E.M., N. Ramnath, G.Y. Yang, J.Y. Ahn, Y. Park, T. Lee, H.S. Shin, J. Yu, C. Ip, et Y.M. Park. 2007. « High Superoxide Dismutase and Low Glutathione Peroxidase Activities in Red Blood Cells Predict Susceptibility of Lung Cancer Patients to Radiation Pneumonitis ». *Free Radical Biology & Medicine* 42: 280-87. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.10.044>.

Patyal, Baldev. 2007. « Dosimetry Aspects of Proton Therapy ». *Technology in Cancer Research & Treatment* 6 (4 Suppl): 17-23. <https://doi.org/10.1177/15330346070060S403>.

Rutz, Hans Peter, Damien C. Weber, Gudrun Goitein, Carmen Ares, Alessandra Bolsi, Antony J. Lomax, Eros Pedroni, Adolf Coray, Eugen B. Hug, et Beate Timmermann. 2008. « Postoperative Spot-Scanning Proton Radiation Therapy for Chordoma and Chondrosarcoma in Children and Adolescents: Initial Experience at Paul Scherrer Institute ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 71 (1): 220-25. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2007.09.014>.

Shapiro, et A. Recht. 2001. « Side Effects of Adjuvant Treatment of Breast Cancer ». *The New England Journal of Medicine* 344 (26): 1997-2008. <https://doi.org/10.1056/NEJM200106283442607>.

St. James, Sara, Clemens Grassberger, et Hsiao-Ming Lu. 2018. « Considerations when treating lung cancer with passive scatter or active scanning proton therapy ». *Translational Lung Cancer Research* 7 (2): 210-15. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2018.04.01>.

Suman, S, S Kumar, AJ Fornace, et K Datta. 2017. « Persistent oxidative stress in mouse intestinal and colonic epithelial cells after exposure to 12C-ion radiation ». *American Association for Cancer Research* 77 (13): Suppl.

Taheri-Kadkhoda, Zahra, Thomas Björk-Eriksson, Simeon Nill, Jan J. Wilkens, Uwe Oelfke, Karl-Axel Johansson, Peter E. Huber, et Marc W. Münter. 2008. « Intensity-modulated radiotherapy of nasopharyngeal carcinoma: a comparative treatment planning study of photons and protons ». *Radiation Oncology* 3 (1): 4. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-3-4>.

Tommasino, Francesco, et Marco Durante. 2015. « Proton Radiobiology ». *Cancers* 7 (1): 353-81. <https://doi.org/10.3390/cancers7010353>.

Valko, Dieter Leibfritz, Jan Moncol, Mark T. D. Cronin, Milan Mazur, et Joshua Telser. 2007. « Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (1): 44-84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>.

Wang, Dongxu. 2015. « A critical appraisal of the clinical utility of proton therapy in oncology ». *Medical Devices (Auckland, N.Z.)* 8 (octobre): 439-46. <https://doi.org/10.2147/MDER.S65594>.

Warren, D. J., L. Slørdal, et M. A. Moore. 1990. « Tumor-Necrosis Factor Induces Cell Cycle Arrest in Multipotential Hematopoietic Stem Cells: A Possible Radioprotective Mechanism ». *European Journal of Haematology* 45 (3): 158-63. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1990.tb00444.x>.

Widesott, Lamberto, Maurizio Amichetti, et Marco Schwarz. 2008. « Proton Therapy in Lung Cancer: Clinical Outcomes and Technical Issues. A Systematic Review ». *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 86 (2): 154-64. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2008.01.003>.

Xue, Xiao-Lei, Xiao-Dan Han, Yuan Li, Xiao-Fei Chu, Wei-Min Miao, Jun-Ling Zhang, et Sai-Jun Fan. 2017. « Astaxanthin Attenuates Total Body Irradiation-Induced Hematopoietic System Injury in Mice via Inhibition of Oxidative Stress and Apoptosis ». *Stem Cell Research & Therapy* 8 (1): 7. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0464-3>.

Article 3 : Skin transcriptomic study in total body irradiated mice exposed to scattered *versus* scanned proton beams

L'objectif premier de cette étude transcriptomique est la recherche de nouveaux biomarqueurs pouvant ouvrir de nouvelles pistes pour l'étude des effets secondaires cutanés tardifs de la PT. Cette étude a également pour but de chercher d'éventuels différences de réponse après exposition à des faisceaux balayés *versus* diffusés de protons. Nos résultats doivent donc permettre (i) d'identifier les gènes régulés après irradiation avec les protons, (ii) de déterminer la fonction des gènes et les voies de signalisation associées, (iii) de trouver des différences de réponses entre les 2 modes de délivrance des faisceaux de protons, (iv) de faire le lien avec les précédents résultats et (v) d'identifier des biomarqueurs transcriptomiques.

Les prélèvements de peau ont été effectués sur les mêmes souris que pour l'article 2. L'étude transcriptomique a pu être menée grâce au recrutement d'un post-doctorant, Alexandre Leduc, spécialisé dans ce domaine (notamment en bioinformatique) et en collaboration avec Erwan Corre de la plateforme ABiMS (FR 2424 CNRS UPMC).

Les ARN totaux ont été extraits, convertis en ADNc double-brin, fragmentés et séquencés. L'analyse est ensuite faite afin de remapper au génome de référence : la souris C57Bl6. La figure 40 explique le protocole suivi.

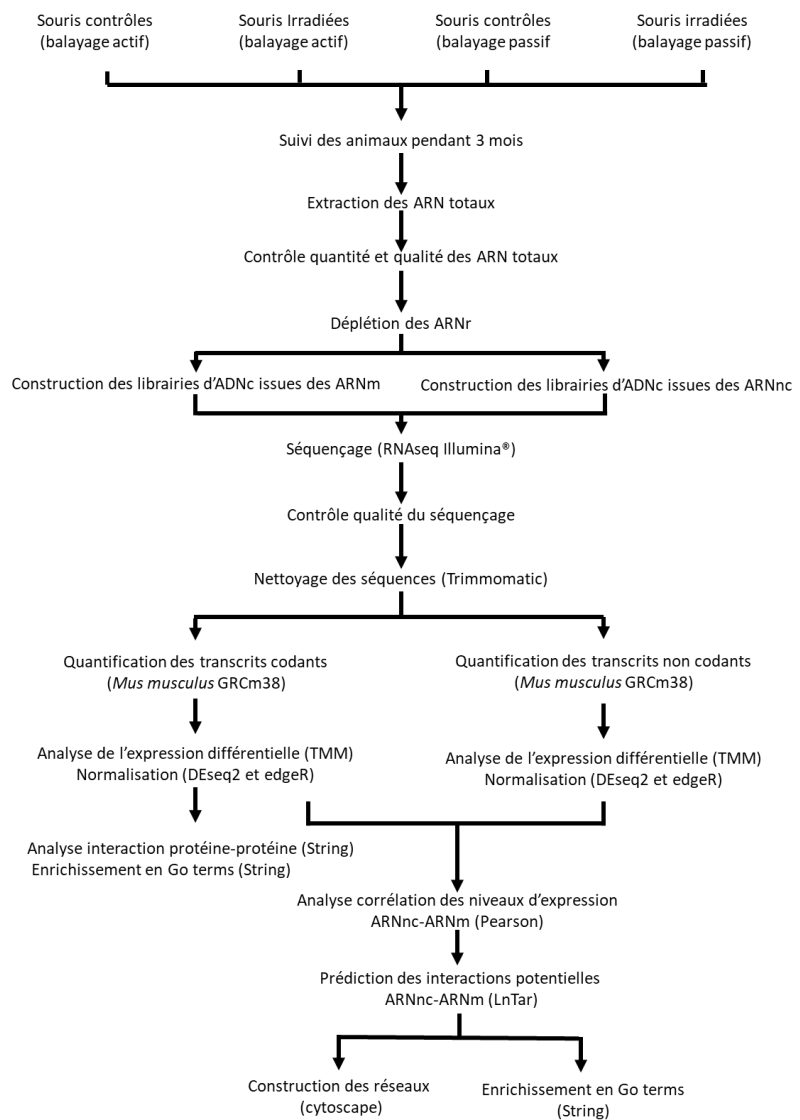


Figure 40. Schéma représentant les étapes du protocole de l'étude transcriptomique.

Les résultats obtenus ont montré que, 3 mois après l'irradiation par des faisceaux de protons balayés ou diffusés, la transcription des gènes est encore très différente de l'état normal dans les souris non-irradiées : 140 et 167 gènes sont différentiellement exprimés (facteur supérieur à 2) après PBS et DS, respectivement. De plus, les profils d'expression sont complètement différents entre les souris exposées au faisceau fixe de celles exposées au faisceau balayé. En effet, un seul gène est commun aux 2 profils : RIKEN cDNA 9930021J03. L'analyse des interactions protéines-protéines possibles (par STRING) montre là aussi des profils complètement différents : 31 et 25 gènes étaient reliés fonctionnellement après faisceau balayé et diffusé, respectivement, mais aucun gène n'est commun. L'analyse de l'enrichissement des termes Gene Ontology (GO-terms) a montré que les gènes régulés après faisceau balayé sont ceux appartenant au développement cutané, ce qui n'est pas le cas du faisceau diffusé. Enfin, l'analyse des ARN non-codants (ARNnc) a aussi montré cette différence de réponse entre les 2 modes de délivrance des protons : 14 ARNnc étaient différentiellement régulés après faisceau balayé et aucun après faisceau diffusé. Les interactions potentielles entre ARNnc et ARNm après faisceau balayé ont montré l'existence de 49 paires potentielles ARNm-ARNnc avec un ARNnc principalement impliqué : Gm44393. Cet ARNnc est un miARN impliqué dans 43 des 49 interactions décrites. Les gènes potentiellement régulés par ce miARN sont encore des gènes liés aux voies des kératines de la peau.

Il paraît donc nécessaire de prendre en compte la différence de réponse des tissus sains entre les 2 modes d'irradiation en protons. De plus, des études plus amples doivent être menées concernant le rôle spécifique du miARN Gm44393 mis en avant dans cette étude et ses cibles potentielles. Elles pourraient permettre une meilleure compréhension des mécanismes conduisant aux toxicités cutanées tardives après PT.

Differential normal skin transcriptomic response in total body irradiated mice exposed to scattered *versus* scanned proton beams

Alexandre Leduc¹, Samia Chaouni¹, Frédéric Pouzoulet², Ludovic De Marzi³, Frédérique Megnin-Chanet⁴, Erwan Corre⁵, Dinu Stefan^{1,6}, Jean-Louis Habrand^{1,6}, François Sichel¹, Carine Laurent^{1,7,†}

¹ Normandie Univ, UNICAEN, UNIROUEN, ABTE-EA4651, Caen, France ; Cancer Centre François Baclesse, Caen, France

² Translational Research Department, Experimental Radiotherapy Platform, Institut Curie, PSL Research University, Orsay, France

³ Institut Curie, PSL Research University, Radiation Oncology Department, Proton Therapy Centre, Centre Universitaire, Orsay, France ; Institut Curie, PSL Research University, University Paris Saclay, Inserm U 1021-CNRS UMR 3347, Orsay, France

⁴ INSERM 1030, Univ Paris-Sud, Univ Paris-Saclay, Department of Radiation Oncology, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France

⁵ CNRS, Sorbonne Université, FR2424, ABiMS platform, Station Biologique, Roscoff, France

⁶ Radiotherapy Department, Cancer Centre François Baclesse, Caen, France

⁷ SAPHYN/ARCHADE (Advanced Resource Centre for HADrontherapy in Europe), Cancer Centre François Baclesse, Caen, France

† Correspondence: carine.laurent@unicaen.fr

Keywords: protontherapy; Double Scattering; Pencil Beam Scanning; side effects; skin; transcriptomic; mRNA; ncRNA

Abstract

Protontherapy allows to avoid excess radiation dose on normal tissues surrounding the tumor. However, there are some limitations due to heterogeneity in the lateral penumbra but also to dose delivery: accumulation of plateau phases in normal tissues upstream of the tumor related to the Spread-Out Bragg Peak (SOBP) and beam delivery techniques. Indeed, proton beams are delivered by two ways: passive (scattered) or active (scanned). Passive delivery result in an increase in the lateral dose upstream of the tumor and active scanning leads to strong differences in dose delivery (time, dose rate, fractionation) between the distal and the proximal layers. This study aims to assess possible differences in the transcriptomic response of skin in C57Bl6 mice after total body irradiation (TBI) irradiation by active or passive proton beams at the dose of 6 Gy compared to unirradiated mice. In that purpose, total RNA was extracted from skin samples 3 months after irradiation and RNA-Seq was performed. Results showed that active and passive delivery lead to completely different transcription profiles. Indeed, 140 and 167 genes were differentially expressed after active and passive scanning compared to unirradiated, respectively, with only one common gene corresponding to RIKEN cDNA 9930021J03. Moreover, protein-protein interactions performed by STRING analysis showed that 31 and 25 genes are functionally related after active and passive delivery, respectively, with no common gene between both types of proton delivery. GO terms analysis showed that active scanning led to the regulation of genes involved in skin development which was not the case with passive delivery. Moreover, 14 ncRNA were differentially regulated after active scanning against none for passive delivery. Potential mRNA-ncRNA interactions after active scanning were investigated leading to 49 mRNA-ncRNA pairs with one ncRNA mainly involved, Gm44383 which is a miRNA, leading to 43 on the 49 possible interactions. The 43 genes potentially regulated by the miRNA Gm44393 confirmed an important role of active scanning on skin keratin pathway. Our results demonstrated that there are differences in skin gene expression still 3 months after proton irradiation *versus* unirradiated mouse skin. And strong differences do exist in late skin gene expression between scattered or scanned proton beams. Further investigations are strongly needed to understand this discrepancy and to improve treatments by PT.

Introduction

Radiotherapy is a double-edge sword as it can be efficient on tumors but it can also alter normal tissues crossed by the radiations. Protontherapy (PT) should allow to avoid side effects on

healthy tissues as the dose deposit is maximal at the end of the beam course under the form of a Bragg peak. Moreover, PT is often indicated for children cancers when organ at risk (OAR) are at proximity of the tumors. However, toxicities are still encountered after treatment by PT. Indeed, several studies on pediatric patients treated by PT for medulloblastoma (Yock et al. 2016), brain tumors (Gunther et al. 2015), head and neck cancers (Bölling et al. 2015) and lung tumors (Green et al. 2015) have shown an increase in side effects compared to conventional radiotherapy, including Intensity-modulated radiotherapy.

These toxicities could be linked to the limitations of PT. Indeed, heterogeneity can occur in the lateral penumbra due to the variety of tissues encountered (Lomax 2008). Moreover, to treat the entire volume of a tumor, Bragg peaks have to be added (SOBP, Spread-Out Bragg Peak) thus resulting in an increase in the dose received upstream of the tumor where plateau phases are also added (Laurent 2018). In addition, PT can be delivered by two different techniques: passive - or scattered - beams or active - or scanned - beams. Passive beam delivery is the older technique: dose is delivered by a scattered proton beam which conforms to the tumor by collimators and compensator. This results in an increase in the lateral dose upstream of the tumor in normal tissues (Wang 2015) as shown in patients treated for breast cancer (MacDonald et al. 2013). Active beam delivery allows a better conformation of the dose to the tumor (Wang 2015) but it leads to strong disparities in dose delivery in normal and tumor tissues in terms of: (i) dose rate (up to several Gy/s in the distal layer of the tumor) ; (ii) duration (some seconds in the distal zone compared to several minutes in the proximal layer) ; and (iii) fractionation (dose delivered at once for the most distal part compared to a lot of times in the proximal part) (De Marzi 2016). This can result in differences in biological responses in OAR localized near the tumor.

In the literature, there are few studies concerning effects of irradiation in the plateau phase before SOBP of proton beams on transcription in normal tissues. Gridley *et al.* have shown an increase in gene expression of Prdx6 and Sod3 only after TBI (total body irradiation) proton irradiation in mice (D. S. Gridley et al. 2011). In the same manner, an increase in the transcription of NOX4 was observed by Chang *et al.* in hematopoietic stem cells after TBI proton mouse irradiation (Chang et al. 2015). In rat eye exposed to proton beams, Mao *et al.* have shown an increase in the expression of genes involved in apoptosis and oxidative stress response (Mao et al. 2010). In mouse brain, the expression of genes related to oxidative stress was also changed after protons compared to photons (Baluchamy et al. 2010). In an *in vitro* model of primary dermal fibroblasts, Nielsen *et al.* have shown that transcription of genes involved in inflammation and malignant transformation were differentially regulated by protons

compared to photons (Nielsen et al. 2019). And there are even less studies on gene expression after PBS *versus* DS proton beams. Gridley *et al.* assessed 152 genes related to p53 and DNA damage pathways in human lung epithelial cells, only 2 genes were differentially expressed by a factor more than 2 in the plateau phase before the Bragg peak : BTG2 and SIAH1 concerning passive delivery, and only one : WT1 for active scanning (Daila S. Gridley et al. 2015).

Conventional paradigm is that ionizing radiations mainly act via DNA damage (Goodhead 2010). More recent observations led to rethink this theory. Actually, epigenetic effects are one the most relevant pathways with non-targeted effects (for review, (Belli et Tabocchini 2020)). Among epigenetic modifications, DNA methylation, histone modifications and non-coding RNAs (ncRNAs) modulations are the most important. Indeed, human genome code for 98% for ncDNA. Resulting ncRNAs, like lncRNAs and miRNA, can regulate mRNAs by inhibiting their translation or by inducing their degradation (Carthew et Sontheimer 2009; Fabian, Sonenberg, et Filipowicz 2010). miRNAs levels were shown to change after irradiation in *in vitro* models (X. H. Li et al. 2012; Aypar, Morgan, et Baulch 2011; Wagner-Ecker et al. 2010; Chaudhry, Kreger, et Omaruddin 2010) and also *in vivo* (Acharya et al. 2015; Gao et al. 2017; Ghosh et al. 2016). They could play an essential role in cell death and cycle arrest (Halimi et al. 2012). Therefore, miRNAs are interesting targets to study as they could be implicated in radiation sensitivity (Metheetairut et Slack 2013; Gong et al. 2015; El Bezawy et al. 2019; Chaudhry 2014; Cellini et al. 2014). Khan *et al.* showed that 2 Gy TBI irradiation of mice led to specific patterns of miRNAs according to the organ in brain, testis and liver (Khan et al. 2013).

Our study aims at evaluating transcriptional responses after PBS *versus* DS proton beams. In this purpose, C57Bl6 which are able to develop side effects after irradiation, were total body irradiated in the plateau phase before the SOBP and skin samples were taken 3 months after irradiation to perform transcriptional analysis of total RNA, *i.e.* mRNA and ncRNA. Sequencing led to the differentially expressed genes (DEGs), STRING analysis revealed potential protein-protein interactions and analysis of GO-terms enrichments allowed to point out implicated pathways. Potential interactions between mRNAs of regulated genes and ncRNAs were also investigated.

Materials and methods

Animals

Ten weeks-old C57Bl6 mice were purchased at Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). C57Bl6 mice had been specifically selected for genetic background. C57Bl6 are known to allow the development of late side effects after irradiation unlike other genetic backgrounds that preferentially develop early effects. To overcome the impact of the ovarian cycle and thus avoid a known sex effect in radiation-induced carcinogenesis, experiments were performed on male animals (Roberts, Morgan, et Danford 1997). Mice were housed in a continuously controlled environment, with enrichment adapted to their species. Seven days were observed between the arrival of the mice and the application of the experimental procedures to allow them to acclimatize to their new environment and thus limit their stress.

Ethics statement

All experimental procedures involving mice were conducted in compliance with the experimental research protocol approved by the Committee of Ethics and Animal Experimentation of Orsay Proton Therapy Center (CPO) and in accordance with the Guidelines of the European Union Council (86/609/ EU) for the use of laboratory animals.

Total body irradiation with PBS or DS proton beams

Irradiations were performed at the CPO using a 235MeV proton beams either Double Scattered (DS) or Pencil Beam Scanned (PBS). Mice received a single sub-lethal dose of 6 Gy in the plateau phase of the Spread-Out Bragg Peak (SOBP). Mice were anesthetized with 4% isoflurane before being placed in prone position on a stage positioned in the irradiation field. The legs and tail of the mouse were taped with a flexible adhesive tape to prevent movement. The anesthesia was maintained with the mask throughout the irradiation, which will last a maximum of 15 minutes. Isoflurane was set up at 1.5-2%. Mouse is detached after irradiation and placed in a clean cage during the awakening time. After irradiation, animals were activated. Indeed, they contained radionuclides with a short half-life and are therefore considered sources of ionizing radiation. They were stayed at the CPO for as long as it takes for the dose to decrease before being returned to the breeding animal facility. For this dose, maximum decay time was 2 hours. Precise measurements of radioactivity were taken in direct contact with animals using specific detectors.

Follow-up and skin taking

Mice statute was monitored with caution during seven day after irradiation to detect any early signs of distress or ill-being. Mice were sacrificed 3 months after irradiation or when a weight

loss greater than 20% of the initial weight was observed. When the mice were sacrificed, total exsanguination was performed to avoid the presence of blood in skin samples. In brief, mice were deeply anesthetized under 5% isoflurane throughout sampling. Rib cage was opened and then the blood was taken by direct puncture into the heart using a 25G needle followed by cervical dislocation after blood sampling. Then, skin from posterior legs (and other organs for another study) were collected.

mRNA and ncRNA sequencing

Total RNAs from posterior leg skin of three mice were extracted separately for the same replicate. Tissues were crushed with a Spex cryogenic grinder (SPEXTMSamplePrep LLC, Methuen, NJ) prior to be put in 1 mL of TRIzol (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Solvent extraction was performed following the manufacturer's instructions. Final RNA concentrations were determined by spectrophotometry (NanoDrop 2000; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). RNA quality was assessed from A260/A280 ratios, and RNA integrity was assessed by denaturing gel electrophoresis. The three RNA samples from same replicate were then pooled before generating cDNA libraries. The total RNA concentration of each sample was quantified using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). A twelve-sample stranded library preparation was performed using a NEB rRNA-depleted (HMR) Kit. The sequencing of 100-pb paired-end reads was performed on an Illumina Novaseq 6000 Sequencer.

Bioinformatics

The raw datasets for the twelve libraries were cleaned with Trimmomatic v0.39: (using defaults parameters) (Bolger, Lohse, et Usadel 2014). Quantification for the abundances of transcripts was performed using pseudo-aligner Salmon v1.1.0 (Patro et al. 2017) against cDNA or ncRNA of *Mus musculus* GRCm38 database. Differential gene expression analyses were performed using TMM (Mark D Robinson et Oshlack 2010) normalization counts by DEseq2 [Love, 2014] and edgeR (M. D. Robinson, McCarthy, et Smyth 2010). Significant (p-value adj. < 0.05) differentially expressed genes (DEGs) (fold change ≥ 2) were analyzed. A STRING analysis (v11.0, <https://string-db.org>) was performed (minimum interaction score >0.7) to reveal potential protein interaction encoded by DEGs and corresponding Go terms enrichments (Mering 2003).

For identifying ncRNA-mRNA coexpression only pairs of DEGs mRNA-lncRNA with a Pearson correlation coefficient above 0.98 between TMM expression level were kept. LncTar

software (J. Li et al. 2015) was used to predict potential mRNA-ncRNA interaction (using ndG < -0.20).

Statistics

Body weights were analyzed by one-way ANOVA (normality and homogeneity of variances were previously checked). Differences were considered significant at $P < 0.05$. Differential expression analyses and other resulting analyses were conducted by comparing the expression levels of the transcribed between irradiated mice group and their respective non-irradiated control group.

Results

Follow-up of the mice

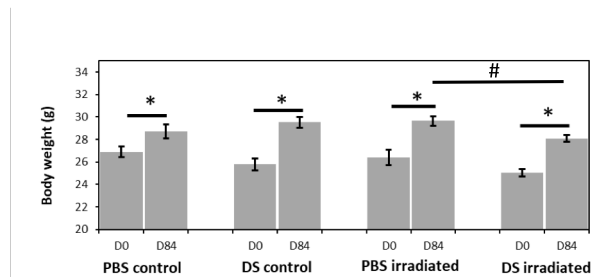


Figure 1. Average mouse weight after 3 months of breeding. Error bars represent standard error of the mean (SEM). * corresponds to a significant difference between irradiated and unirradiated and # corresponds to a significant difference between PBS and DS (one way ANOVA ; $P < 0.05$).

After 84 days, mice irradiated with DS proton beams present a lower average weight than the controls and the group of mice irradiated with PBS proton beams. No mice died or were euthanized due to weight loss greater than 20% of the initial weight. All mice significantly increased their weight during the 3 months of breeding. The two control groups of non-irradiated mice showed no significant differences. Mice irradiated with DS proton beam had significantly lower weights than mice irradiated with PBS proton beam. Moreover, all mice presented hair depigmentation.

Overview of the sequencing

Table 1. Overview of sequencing, assembly and analysis.

	DS	PBS
Total number of bases sequenced	93 995 555 464	85 127 017 962
Reads	465 324 532	421 420 881
Remapping (mRNA+ncRNA)	74,35%	77,16%
mRNA transcripts identified	34 093	36 747
ncRNA transcripts identified	19 746	19 738
Number of coding DEGs	167	140
Number of non-coding DEGs	0	14
Number of putative interactions ncRNA-mRNA	0	49

Table 1 provides an overview of sequencing matrix. Three replicates of pooled total RNAs from three different animal were sampled by experiment (DS and PBS) and by dose condition (0 and 5.7 Gy). In the end, 12 cDNA libraries were sequenced. Despite a lower number of reads in the 6 PBS proton beam samples, the remapping as well as the number of identifications was greater than DS proton beam samples testifying to a greater sample homogeneity within DS proton beam experiment.

Quantitative analysis of the differentially expressed gene number

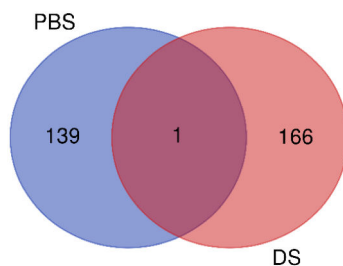


Figure 2. Distribution of differentially expressed genes between irradiated mice and their corresponding control group. Numbers corresponds to transcripts whose expression levels vary by more than a factor 2 and whose adjusted *P value* is less than 0.05.

Filtering of differentially expressed transcribed ($|\text{FC}| > 2$; $\text{padj} < 0.05$) showed that 140 and 167 genes were still regulated 3 months after the irradiation of mice with PBS and DS proton beam respectively (Figure 2). Only ENSMUST0000175764.8 corresponding to RIKEN cDNA 9930021J03 gene is regulated by both types of irradiation.

List of differentially expressed genes

Table 2. List of differentially expressed genes three month after PBS irradiation.

Log2FC: variation factor in log2 ; padj: p-value adjusted.

Transcript stable ID version	Gene name	Gene description	log2FC	padj
ENSMUST00000031583.14	Acacb	acetyl-Coenzyme A carboxylase beta	-1,31	4,3E-02
ENSMUST00000007340.3	Atp12a	ATPase, H+/K+ transporting, nongastric, alpha polypeptide	1,35	1,1E-02
ENSMUST00000166646.1	Abcc4	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4	-1,17	2,5E-02
ENSMUST00000173433.7	Baz1a	bromodomain adjacent to zinc finger domain 1A	1,33	3,3E-05
ENSMUST00000170054.8	Baz2a	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2A	10,98	1,5E-14
ENSMUST00000048052.6	Calhm4	calcium homeostasis modulator family member 4	2,75	3,0E-04
ENSMUST00000066880.5	Capn12	calpain 12	2,07	2,0E-03
ENSMUST00000020399.5	Cpm	carboxypeptidase M	1,42	1,7E-02
ENSMUST00000169576.7	Cnot2	CCR4-NOT transcription complex, subunit 2	1,18	5,6E-04
ENSMUST00000028780.3	Chac1	ChaC, cation transport regulator 1	1,88	4,0E-03
ENSMUST00000048665.7	Chd9	chromodomain helicase DNA binding protein 9	1,14	4,4E-02
ENSMUST00000022616.13	Clu	clusterin	1,03	3,6E-02
ENSMUST00000175975.8	Cux1	cut-like homeobox 1	1,27	6,4E-03
ENSMUST00000176778.7	Cux1	cut-like homeobox 1	1,63	1,2E-03
ENSMUST00000122919.7	Ccnl1	cyclin L1	1,28	5,9E-03
ENSMUST00000085691.10	Dmkn	dermokine	9,87	7,0E-12
ENSMUST00000019426.4	Dsg4	desmoglein 4	2,91	1,6E-05
ENSMUST00000092768.6	Dlx3	distal-less homeobox 3	2,33	9,1E-04
ENSMUST00000020118.4	Dusp6	dual specificity phosphatase 6	1,01	2,2E-03
ENSMUST00000112435.8	Ep400	E1A binding protein p400	-1,20	3,8E-04
ENSMUST00000225200.1	Egr3	early growth response 3	1,20	5,9E-03
ENSMUST00000049053.8	Fam168a	family with sequence similarity 168, member A	1,06	1,4E-04
ENSMUST00000189017.7	Fat1	FAT atypical cadherin 1	-1,14	1,9E-02
ENSMUST00000132151.7	Fsd1l	fibronectin type III and SPRY domain containing 1-like	-1,81	2,2E-02
ENSMUST00000114299.7	Flna	filamin, alpha	-1,11	1,4E-04
ENSMUST00000234834.1	Fhod3	formin homology 2 domain containing 3	3,40	1,9E-05
ENSMUST00000111922.1	Gprc5d	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member D	4,08	6,2E-06
ENSMUST00000068581.8	Gja1	gap junction protein, alpha 1	1,67	2,4E-03
ENSMUST00000055698.7	Gjb2	gap junction protein, beta 2	4,40	1,3E-06
ENSMUST00000159985.1	Heph1l	hephaestin-like 1	1,11	1,8E-02
ENSMUST00000090002.9	Hnrnpa2b1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	1,38	1,4E-03

ENSMUST0000001700.6	Hoxc13	homeobox C13	1,51	4,1E-02
ENSMUST00000113453.8	Hopx	HOP homeobox	1,06	5,2E-03
ENSMUST00000112604.7	Iqsec2	IQ motif and Sec7 domain 2	-1,01	3,4E-02
ENSMUST00000007280.8	Krt16	keratin 16	1,13	8,5E-04
ENSMUST00000038004.2	Krt25	keratin 25	5,50	1,5E-07
ENSMUST00000017732.2	Krt27	keratin 27	5,26	5,2E-08
ENSMUST00000006963.2	Krt28	keratin 28	3,77	6,9E-09
ENSMUST00000007318.1	Krt31	keratin 31	5,16	4,2E-06
ENSMUST00000018399.2	Krt33a	keratin 33A	5,45	8,0E-07
ENSMUST00000073890.3	Krt33b	keratin 33B	5,05	2,6E-05
ENSMUST00000056362.2	Krt34	keratin 34	4,98	1,3E-04
ENSMUST00000103127.3	Krt35	keratin 35	7,89	1,7E-03
ENSMUST00000023788.7	Krt6a	keratin 6A	1,13	1,7E-17
ENSMUST00000023710.5	Krt71	keratin 71	5,78	1,3E-08
ENSMUST00000071104.5	Krt72	keratin 72	4,58	5,2E-14
ENSMUST00000063292.7	Krt73	keratin 73	4,04	3,4E-04
ENSMUST00000061185.7	Krt81	keratin 81	5,16	9,4E-06
ENSMUST00000023718.8	Krt83	keratin 83	5,76	1,2E-06
ENSMUST00000088049.4	Krt86	keratin 86	5,08	2,9E-05
ENSMUST00000081945.4	Krt87	keratin 87	4,73	4,0E-05
ENSMUST00000171542.1	Krtap11-1	keratin associated protein 11-1	5,82	3,6E-06
ENSMUST00000104930.1	Krtap1-3	keratin associated protein 1-3	5,71	6,7E-10
ENSMUST00000189774.1	Krtap14	keratin associated protein 14	5,92	2,6E-07
ENSMUST00000100479.2	Krtap1-4	keratin associated protein 1-4	4,82	7,4E-07
ENSMUST00000187823.1	Krtap15	keratin associated protein 15	6,52	4,1E-06
ENSMUST00000054532.4	Krtap1-5	keratin associated protein 1-5	5,89	8,8E-06
ENSMUST00000105050.3	Krtap16-1	keratin associated protein 16-1	3,43	2,6E-03
ENSMUST00000179707.2	Krtap16-3	keratin associated protein 16-3	4,70	1,7E-04
ENSMUST00000074926.5	Krtap2-4	keratin associated protein 2-4	5,48	9,1E-05
ENSMUST00000055502.4	Krtap3-1	keratin associated protein 3-1	6,16	9,1E-06
ENSMUST00000092699.2	Krtap3-2	keratin associated protein 3-2	3,35	2,9E-02
ENSMUST00000081007.6	Krtap4-1	keratin associated protein 4-1	5,80	2,4E-04
ENSMUST00000107437.1	Krtap4-16	keratin associated protein 4-16	5,09	5,5E-04
ENSMUST00000058987.4	Krtap4-2	keratin associated protein 4-2	4,00	9,1E-05
ENSMUST00000100476.2	Krtap4-6	keratin associated protein 4-6	5,26	2,0E-08
ENSMUST00000055121.6	Krtap4-7	keratin associated protein 4-7	5,43	1,3E-04
ENSMUST00000107439.1	Krtap4-8	keratin associated protein 4-8	4,49	3,2E-07
ENSMUST00000105059.3	Krtap4-9	keratin associated protein 4-9	3,68	1,0E-04
ENSMUST00000056118.3	Krtap7-1	keratin associated protein 7-1	6,88	3,5E-08
ENSMUST00000072280.4	Krtap8-1	keratin associated protein 8-1	6,49	2,4E-07
ENSMUST00000062683.2	Krtap9-3	keratin associated protein 9-3	6,01	1,3E-09
ENSMUST00000081496.5	Ltbp3	latent transforming growth factor beta binding protein 3	1,96	3,2E-03
ENSMUST00000021607.8	Lgmn	legumain	1,42	1,3E-02
ENSMUST00000046122.10	Lap3	leucine aminopeptidase 3	1,14	2,5E-02
ENSMUST00000064606.7	Lrrc15	leucine rich repeat containing 15	2,76	2,1E-02
ENSMUST00000116273.8	Kdm1a	lysine (K)-specific demethylase 1A	1,32	1,2E-04

ENSMUST0000070658.15	Mgrn1	mahogunin, ring finger 1	1,09	3,5E-05
ENSMUST0000062356.6	Marcks1	MARCKS-like 1	1,19	4,4E-02
ENSMUST0000037991.11	Mical2	microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 2	1,18	2,0E-03
ENSMUST00000120259.7	Map3k5	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	1,41	4,5E-03
ENSMUST00000194069.5	Mbnl1	muscleblind like splicing factor 1	1,50	2,9E-05
ENSMUST00000071935.6	Myo9b	myosin IXb	1,29	2,3E-09
ENSMUST00000167856.7	Myo18a	myosin XVIIIa	1,22	1,9E-02
ENSMUST00000071065.7	Nfil3	nuclear factor, interleukin 3, regulated	1,01	5,2E-03
ENSMUST00000030025.9	Nr4a3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	1,88	2,1E-02
ENSMUST00000215340.1	Olf536	olfactory receptor 536	-10,09	2,1E-13
ENSMUST00000171737.2	Odc1	ornithine decarboxylase, structural 1	1,11	7,8E-06
ENSMUST00000023698.11	Paxbp1	PAX3 and PAX7 binding protein 1	1,27	3,3E-02
ENSMUST00000026378.3	Padi1	peptidyl arginine deiminase, type I	2,81	6,5E-04
ENSMUST00000026377.8	Padi3	peptidyl arginine deiminase, type III	6,89	3,7E-04
ENSMUST00000172098.1	Padi3	peptidyl arginine deiminase, type III	1,68	8,5E-03
ENSMUST00000051226.7	Pfkm	phosphofructokinase, muscle	1,29	3,4E-05
ENSMUST00000011776.7	Pinlyp	phospholipase A2 inhibitor and LY6/PLAUR domain containing	3,36	1,8E-06
ENSMUST00000101376.2	Plb1	phospholipase B1	1,39	3,0E-02
ENSMUST00000222485.1	Pitrm1	pitrilysin metallopeptidase 1	1,12	1,9E-02
ENSMUST00000054449.13	Plec	plectin	12,04	5,0E-19
ENSMUST00000092694.3	Gm11559	predicted gene 11559	2,68	1,2E-03
ENSMUST00000073853.2	Gm11562	predicted gene 11562	5,70	4,7E-05
ENSMUST00000092695.4	Gm11563	predicted gene 11563	4,81	7,4E-07
ENSMUST00000078442.3	Gm11567	predicted gene 11567	4,11	7,2E-06
ENSMUST00000107440.1	Gm11595	predicted gene 11595	4,54	1,8E-07
ENSMUST00000076478.1	Gm11937	predicted gene 11937	5,16	4,6E-02
ENSMUST00000072306.3	Gm11938	predicted gene 11938	5,45	6,2E-06
ENSMUST00000230067.1	Gm49425	predicted gene, 49425	5,51	2,3E-06
ENSMUST00000070284.3	Prr9	proline rich 9	3,39	5,5E-04
ENSMUST00000036248.12	Pmepa1	prostate transmembrane protein, androgen induced 1	1,09	2,6E-02
ENSMUST00000025273.8	Psors1c2	psoriasis susceptibility 1 candidate 2 (human)	3,84	4,5E-03
ENSMUST00000086801.6	Rfx2	regulatory factor X, 2 (influences HLA class II expression)	1,18	1,9E-02
ENSMUST00000175764.8	9930021J03Rik	RIKEN cDNA 9930021J03 gene	1,03	7,4E-04
ENSMUST00000098098.8	Rnf38	ring finger protein 38	1,23	1,2E-03
ENSMUST00000009679.10	Rnmt	RNA (guanine-7-) methyltransferase	1,22	2,4E-02
ENSMUST00000059647.11	Rbm12	RNA binding motif protein 12	1,66	4,2E-02
ENSMUST00000001047.7	S100a3	S100 calcium binding protein A3	5,17	3,6E-05
ENSMUST00000063417.10	Srsf7	serine and arginine-rich splicing factor 7	1,40	5,2E-07
ENSMUST00000226785.1	Styx	serine/threonine/tyrosine interaction protein	1,26	3,9E-03
ENSMUST00000222714.1	Sipa111	signal-induced proliferation-associated 1 like 1	10,32	1,7E-13
ENSMUST00000037064.4	Slc25a37	solute carrier family 25, member 37	1,09	7,1E-03
ENSMUST00000184497.1	Slc25a37	solute carrier family 25, member 37	1,12	1,7E-02
ENSMUST00000022787.7	Slc7a8	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 8	2,23	2,7E-05

ENSMUST00000110030.9	Snx5	sorting nexin 5	1,78	6,6E-03
ENSMUST00000093039.5	Taf5l	TATA-box binding protein associated factor 5 like	1,44	2,7E-02
ENSMUST00000165628.8	Taf5l	TATA-box binding protein associated factor 5 like	-1,05	1,1E-02
ENSMUST00000213235.1	Taf1d	TATA-box binding protein associated factor, RNA polymerase I, D	1,23	4,0E-03
ENSMUST00000142577.1	Txlna	taxilin alpha	1,39	2,9E-02
ENSMUST00000089024.12	Tcp1	t-complex protein 1	1,30	6,1E-03
ENSMUST00000165978.2	Tecpr2	tectonin beta-propeller repeat containing 2	-1,89	2,7E-05
ENSMUST00000107377.9	Tnc	tenascin C	1,69	2,6E-03
ENSMUST00000098603.7	Tet2	tet methylcytosine dioxygenase 2	11,23	3,9E-15
ENSMUST00000039559.8	Thbs1	thrombospondin 1	1,19	2,9E-05
ENSMUST00000064257.5	Tchh	trichohyalin	5,17	2,1E-08
ENSMUST00000029516.2	Tchhl1	trichohyalin-like 1	3,21	2,7E-05
ENSMUST00000105527.1	Tnfrsf25	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	-1,21	2,7E-02
ENSMUST00000207748.1	Ucp2	uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)	1,53	1,0E-02
ENSMUST00000042503.8	Usp6nl	USP6 N-terminal like	1,18	3,8E-02
ENSMUST00000233808.1	Vmn1r226	vomer nasal 1 receptor 226	10,60	3,7E-13
ENSMUST00000111635.2	Xirp1	xin actin-binding repeat containing 1	1,51	2,6E-02
ENSMUST00000066617.11	Zkscan1	zinc finger with KRAB and SCAN domains 1	9,71	1,4E-10
ENSMUST00000036176.14	-	-	1,94	3,6E-05
ENSMUST00000107272.5	-	-	-10,18	7,1E-06

Table 2 presents the list of mouse differentially expressed transcripts three months after irradiation with PBS proton beam and compared to non-irradiated mice group. Only 4 genes showed two isoforms: Cux1, Padi3, Taf5l and Slc25a37. Keratin-related genes were highly represented: 17 transcripts coding for keratin and 21 for keratin associated proteins.

Table 3. List of differentially expressed genes three month after DS irradiation.

Log2FC: variation factor in log2 ; padj: p-value adjusted.

Transcript stable ID version	Gene name	Gene description	log2FC	padj
ENSMUST00000030221.2	Hacd4	3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 4	6,62	3,4E-02
ENSMUST00000113059.7	Adamts7	a disintegrin-like and metalloproteinase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 7	4,56	3,9E-02
ENSMUST00000106824.7	Ap4b1	adaptor-related protein complex AP-4, beta 1	7,29	2,3E-05
ENSMUST0000020984.8	Adcy3	adenylate cyclase 3	8,13	6,3E-08
ENSMUST00000187485.6	Adgrb1	adhesion G protein-coupled receptor B1	-7,22	4,9E-05
ENSMUST00000053106.6	Amigo2	adhesion molecule with Ig like domain 2	-6,84	3,1E-02
ENSMUST00000166075.7	Arf4	ADP-ribosylation factor 4	-1,68	4,3E-03
ENSMUST00000179758.7	Adtrp	androgen dependent TFPI regulating protein	7,78	6,7E-07
ENSMUST00000182064.8	Ank2	ankyrin 2, brain	-9,02	3,1E-09
ENSMUST00000025483.10	Nars	asparaginyl-tRNA synthetase	8,87	6,1E-07
ENSMUST00000176192.2	Atpaf1	ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1	7,42	1,5E-05

ENSMUST00000182627.7	Atp13a4	ATPase type 13A4	-7,20	1,9E-04
ENSMUST0000005830.14	Bcas2	breast carcinoma amplified sequence 2	-6,92	7,2E-04
ENSMUST00000112550.7	Baz2b	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2B	1,52	2,0E-03
ENSMUST00000063597.13	Casr	calcium-sensing receptor	7,93	3,2E-06
ENSMUST00000114847.8	Casr	calcium-sensing receptor	-7,83	6,7E-07
ENSMUST00000078752.9	Casc4	cancer susceptibility candidate 4	1,71	1,6E-03
ENSMUST00000110586.9	Casc4	cancer susceptibility candidate 4	-9,67	3,0E-11
ENSMUST00000164088.7	Cnot2	CCR4-NOT transcription complex, subunit 2	9,15	2,2E-10
ENSMUST00000167086.1	Cd101	CD101 antigen	6,99	1,4E-02
ENSMUST00000114548.7	Cadm1	cell adhesion molecule 1	1,67	3,7E-02
ENSMUST00000128557.2	Champ1	chromosome alignment maintaining phosphoprotein 1	-8,35	4,1E-05
ENSMUST00000203646.2	Clasp1	CLIP associating protein 1	2,18	1,1E-02
ENSMUST00000220227.1	Coq10a	coenzyme Q10A	7,43	3,6E-03
ENSMUST0000027766.12	Coq8a	coenzyme Q8A	8,78	1,6E-08
ENSMUST00000109651.8	Cobl	cordón-bleu WH2 repeat	-8,46	9,0E-08
ENSMUST00000237125.1	Coro1b	coronin, actin binding protein 1B	6,63	2,0E-02
ENSMUST0000029866.15	Ccne2	cyclin E2	1,86	1,9E-03
ENSMUST0000026416.14	Cdk2	cyclin-dependent kinase 2	-1,16	4,9E-02
ENSMUST00000069937.10	Cdkl2	cyclin-dependent kinase-like 2 (CDC2-related kinase)	8,17	1,3E-06
ENSMUST00000229524.1	Cyhr1	cysteine and histidine rich 1	7,16	1,5E-03
ENSMUST00000112302.7	Ctps2	cytidine 5'-triphosphate synthase 2	-1,74	1,7E-02
ENSMUST00000197489.4	Dcun1d1	DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 1 (S. cerevisiae)	7,64	5,1E-06
ENSMUST00000110625.7	Ppip5k1	diphosphoinositol pentakisphosphate kinase 1	-8,24	1,9E-05
ENSMUST00000088976.11	Dnmt3b	DNA methyltransferase 3B	-7,97	1,2E-05
ENSMUST00000139324.7	Donson	downstream neighbor of SON	3,57	3,2E-03
ENSMUST00000093983.10	Evi2	ecotropic viral integration site 2	9,57	1,6E-11
ENSMUST00000170422.3	Evi2	ecotropic viral integration site 2	-9,59	1,3E-11
ENSMUST00000113783.7	Eda	ectodysplasin-A	8,41	1,3E-07
ENSMUST00000132376.1	Ech1	enoyl coenzyme A hydratase 1, peroxisomal	7,09	1,2E-04
ENSMUST00000111110.2	Eif3m	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit M	5,61	5,3E-04
ENSMUST00000115457.7	Eif4g1	eukaryotic translation initiation factor 4, gamma 1	-9,27	6,7E-08
ENSMUST00000097643.9	AW554918	expressed sequence AW554918	-8,69	8,0E-07
ENSMUST00000141972.7	C87436	expressed sequence C87436	6,90	2,2E-02
ENSMUST00000031891.14	Fam131b	family with sequence similarity 131, member B	-7,95	1,0E-05
ENSMUST00000060807.11	Fam83h	family with sequence similarity 83, member H	2,25	4,9E-03
ENSMUST00000136640.7	Fcho1	FCH domain only 1	-6,65	3,4E-02
ENSMUST00000148272.1	Fbn1	fibrillin 1	7,20	6,2E-05
ENSMUST00000178276.7	Fgfr1	fibroblast growth factor receptor 1	-8,86	1,8E-08
ENSMUST00000138581.2	Fnbp1	formin binding protein 1	7,48	1,9E-05
ENSMUST00000172405.7	Ggnbp2	gametogenetin binding protein 2	8,78	3,9E-08
ENSMUST00000114812.8	Golgb1	golgi autoantigen, golgin subfamily b, macrogolgin 1	1,12	2,4E-02
ENSMUST00000078616.11	Gpsm1	G-protein signalling modulator 1 (AGS3-like, C. elegans)	3,13	3,1E-02
ENSMUST00000193597.1	Gucy1b1	guanylate cyclase 1, soluble, beta 1	7,34	3,5E-03
ENSMUST00000238192.1	Hsf2bp	heat shock transcription factor 2 binding protein	-2,92	4,1E-02
ENSMUST00000137865.7	Hp1bp3	heterochromatin protein 1, binding protein 3	7,11	1,0E-04

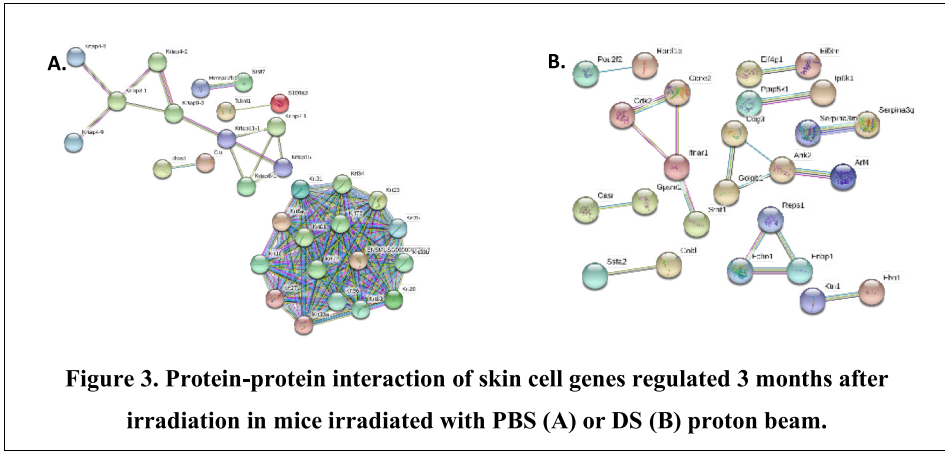
ENSMUST0000072357.13	Hk1	hexokinase 1	8,14	6,0E-06
ENSMUST0000038472.6	Hdx	highly divergent homeobox	-9,22	2,3E-10
ENSMUST00000113422.8	Hdx	highly divergent homeobox	9,16	9,4E-11
ENSMUST00000114130.8	lkbkg	inhibitor of kappaB kinase gamma	-8,88	5,7E-08
ENSMUST00000177158.1	Ip6k1	inositol hexaphosphate kinase 1	6,94	6,6E-04
ENSMUST00000117748.7	Ifnar1	interferon (alpha and beta) receptor 1	7,68	1,3E-06
ENSMUST00000111785.8	Itprid2	ITPR interacting domain containing 2	1,28	4,7E-07
ENSMUST00000173949.1	Jmjd1c	jumonji domain containing 1C	7,58	2,2E-05
ENSMUST00000187262.6	Ktn1	kinectin 1	8,70	3,0E-09
ENSMUST00000118583.7	Ltbp4	latent transforming growth factor beta binding protein 4	1,68	5,9E-06
ENSMUST00000126573.7	Lrp8	low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein e receptor	7,65	9,8E-05
ENSMUST0000058771.12	Lysmd4	LysM, putative peptidoglycan-binding, domain containing 4	6,56	3,1E-02
ENSMUST00000168772.1	Marveld2	MARVEL (membrane-associating) domain containing 2	6,58	4,1E-02
ENSMUST00000225754.1	Marveld2	MARVEL (membrane-associating) domain containing 2	-8,00	2,5E-05
ENSMUST00000106857.7	Mier1	MEIR1 transcription regulator	3,21	3,5E-02
ENSMUST0000025580.9	Ms4a6b	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6B	6,79	4,6E-03
ENSMUST00000100214.9	Miga2	mitoguardin 2	1,60	4,6E-03
ENSMUST00000186442.6	Mndal	myeloid nuclear differentiation antigen like	7,13	1,9E-04
ENSMUST00000102505.9	Myo1c	myosin IC	1,15	1,7E-02
ENSMUST00000151273.7	Gnptab	N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase, alpha and beta subunits	7,57	5,5E-05
ENSMUST00000121778.7	Ndufb5	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit B5	7,28	2,9E-04
ENSMUST00000095947.10	Nrap	nebulin-related anchoring protein	4,85	6,1E-04
ENSMUST00000177020.1	Nptn	neuroplastin	7,38	1,3E-04
ENSMUST00000225583.1	Ntrk2	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	4,46	5,1E-03
ENSMUST00000153353.8	Nop56	NOP56 ribonucleoprotein	7,18	1,7E-04
ENSMUST00000188507.6	Nemp2	nuclear envelope integral membrane protein 2	7,90	5,8E-07
ENSMUST00000213789.2	Olf1065	olfactory receptor 1065	9,41	3,0E-11
ENSMUST00000102609.2	Olf1258	olfactory receptor 1258	9,25	5,9E-11
ENSMUST00000213720.2	Olf1258	olfactory receptor 1258	-9,56	3,0E-11
ENSMUST00000215861.1	Olf1392	olfactory receptor 1392	-7,44	1,6E-03
ENSMUST00000214192.1	Olf1824	olfactory receptor 824	-2,50	2,2E-04
ENSMUST00000173286.7	Otud4	OTU domain containing 4	1,11	1,0E-02
ENSMUST00000141055.1	Otub2	OTU domain, ubiquitin aldehyde binding 2	1,32	1,8E-02
ENSMUST00000150545.7	Pdrg1	p53 and DNA damage regulated 1	7,34	7,5E-05
ENSMUST00000194663.5	Ptch1	patched 1	-1,61	2,0E-04
ENSMUST00000230948.1	Phf20l1	PHD finger protein 20-like 1	-9,09	1,4E-08
ENSMUST00000086123.10	Pitpm2	phosphatidylinositol transfer protein, membrane-associated 2	9,88	2,3E-12
ENSMUST0000004955.13	Prpsap2	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase-associated protein 2	8,02	9,7E-06
ENSMUST00000107044.9	Plekhb1	pleckstrin homology domain containing, family B (evectins) member 1	7,22	8,0E-05
ENSMUST00000200097.4	Ptbp2	polypyrimidine tract binding protein 2	-1,59	3,1E-02
ENSMUST00000185333.1	Kcna6	potassium voltage-gated channel, shaker-related, subfamily, member 6	7,39	7,5E-04
ENSMUST00000108415.9	Pou2f2	POU domain, class 2, transcription factor 2	-2,60	1,3E-07
ENSMUST00000120959.7	Gm14434	predicted gene 14434	7,84	1,3E-06

ENSMUST00000165289.7	Gm3298	predicted gene 3298	-9,32	5,6E-11
ENSMUST00000168733.8	Gm8206	predicted gene 8206	9,04	2,8E-10
ENSMUST0000055576.11	Pcsk6	proprotein convertase subtilisin/kexin type 6	-1,04	1,5E-02
ENSMUST00000184766.7	Prorp	protein only RNase P catalytic subunit	7,29	2,5E-03
ENSMUST00000156263.1	Rad23b	RAD23 homolog B, nucleotide excision repair protein	7,10	1,5E-04
ENSMUST00000154718.7	Reps1	RalBP1 associated Eps domain containing protein	1,85	3,6E-02
ENSMUST0000029180.13	Rprd1b	regulation of nuclear pre-mRNA domain containing 1B	-8,87	1,0E-08
ENSMUST00000105782.1	Rsc1a1	regulatory solute carrier protein, family 1, member 1	8,97	2,8E-09
ENSMUST00000203471.2	Rfc1	replication factor C (activator 1) 1	-8,00	1,8E-07
ENSMUST00000186037.6	Retreg2	reticulophagy regulator family member 2	-8,45	3,9E-08
ENSMUST00000190240.6	Retreg2	reticulophagy regulator family member 2	1,77	9,4E-03
ENSMUST0000003741.15	Rps6ka1	ribosomal protein S6 kinase polypeptide 1	3,69	7,9E-05
ENSMUST00000175764.8	9930021J03Rik	RIKEN cDNA 9930021J03 gene	1,16	4,8E-03
ENSMUST00000149147.7	Rnf157	ring finger protein 157	-1,06	3,5E-03
ENSMUST0000070705.5	Rlim	ring finger protein, LIM domain interacting	1,19	2,0E-02
ENSMUST00000101078.11	Serpina3m	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3M	6,96	5,3E-04
ENSMUST00000168797.1	Serpina3m	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3M	-7,04	5,4E-04
ENSMUST00000102544.8	Srsf10	serine and arginine-rich splicing factor 10	7,48	3,1E-05
ENSMUST00000186857.6	Stat1	signal transducer and activator of transcription 1	8,28	5,7E-08
ENSMUST00000081799.5	Sgsm2	small G protein signaling modulator 2	-1,63	2,0E-02
ENSMUST00000204768.1	Snrpg	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G	6,98	1,1E-03
ENSMUST00000027368.5	Slc11a1	solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1	7,17	1,9E-04
ENSMUST00000184169.7	Slc25a12	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, Aralar), member 12	8,06	4,7E-06
ENSMUST00000237371.1	Slc29a2	solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 2	-6,88	2,6E-03
ENSMUST00000096514.10	Slc35a2	solute carrier family 35 (UDP-galactose transporter), member A2	7,14	9,9E-04
ENSMUST00000212270.1	Slc38a7	solute carrier family 38, member 7	9,31	5,6E-11
ENSMUST00000098816.9	Slc7a2	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2	6,99	6,6E-04
ENSMUST0000055087.6	Syk	spleen tyrosine kinase	-1,35	3,4E-02
ENSMUST00000100496.4	Spryd7	SPRY domain containing 7	7,74	5,3E-05
ENSMUST00000100572.9	Sla	src-like adaptor	7,29	4,2E-05
ENSMUST00000164163.7	Sla	src-like adaptor	-4,30	2,5E-03
ENSMUST00000233897.1	Sod2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	7,76	1,0E-06
ENSMUST00000154059.7	St7	suppression of tumorigenicity 7	-8,21	3,1E-07
ENSMUST00000099131.10	Smarcc2	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 2	1,82	8,7E-04
ENSMUST00000132325.9	Syt6	synaptotagmin VI	-7,32	7,3E-05
ENSMUST00000136189.7	Tbc1d14	TBC1 domain family, member 14	1,48	3,3E-03
ENSMUST00000224480.1	Tut7	terminal uridylyl transferase 7	-8,24	6,9E-07
ENSMUST00000225139.1	Tasor	transcription activation suppressor	-7,78	2,6E-04
ENSMUST0000002391.14	Tm9sf1	transmembrane 9 superfamily member 1	9,10	1,3E-08
ENSMUST0000024833.12	Tmprss3	transmembrane protease, serine 3	-7,82	4,9E-06
ENSMUST00000110163.7	Tmem230	transmembrane protein 230	-7,90	6,7E-06
ENSMUST00000100806.5	Tmem254b	transmembrane protein 254b	4,24	1,1E-02

ENSMUST0000080336.3	Tmem268	transmembrane protein 268	-8,56	1,4E-08
ENSMUST00000153292.7	Trmt2a	TRM2 tRNA methyltransferase 2A	6,82	4,6E-03
ENSMUST00000225936.1	Tpbpa	trophoblast specific protein alpha	-1,08	9,8E-03
ENSMUST00000154004.7	Uty	ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene, Y chromosome	1,01	5,3E-04
ENSMUST00000162313.7	Unc5cl	unc-5 family C-terminal like	2,05	3,4E-02
ENSMUST0000009885.13	Ubp1	upstream binding protein 1	7,78	6,7E-05
ENSMUST0000084885.11	Ubp1	upstream binding protein 1	-7,85	2,9E-04
ENSMUST00000226786.1	Vmn1r198	vomeronasal 1 receptor 198	9,66	3,0E-11
ENSMUST00000227685.1	Vmn1r199	vomeronasal 1 receptor 199	-2,48	3,8E-04
ENSMUST00000226651.1	Vmn1r220	vomeronasal 1 receptor 220	-10,35	1,6E-13
ENSMUST00000227950.1	Vmn1r220	vomeronasal 1 receptor 220	9,36	5,6E-11
ENSMUST00000228498.1	Vmn1r34	vomeronasal 1 receptor 34	-8,81	5,1E-06
ENSMUST00000051822.12	Wdr61	WD repeat domain 61	8,52	2,9E-08
ENSMUST00000121204.7	Wdr61	WD repeat domain 61	-4,67	5,5E-03
ENSMUST00000162541.7	Wnk1	WNK lysine deficient protein kinase 1	8,25	7,9E-07
ENSMUST00000168247.1	Zfp110	zinc finger protein 110	7,27	3,2E-05
ENSMUST00000077485.10	Zfp12	zinc finger protein 12	-8,93	7,0E-10
ENSMUST00000182122.7	Zfp236	zinc finger protein 236	8,89	6,5E-08
ENSMUST00000072292.11	Zfp280c	zinc finger protein 280C	8,75	1,3E-07
ENSMUST00000209061.1	Zfp36	zinc finger protein 36	1,44	1,4E-02
ENSMUST00000234956.1	Zfp598	zinc finger protein 598	7,52	6,8E-05
ENSMUST0000088102.11	Zfx	zinc finger protein X-linked	10,38	5,8E-13
ENSMUST0000022593.6	-	-	8,01	5,9E-06
ENSMUST0000049168.7	-	-	9,26	3,6E-09
ENSMUST00000109261.9	-	-	1,56	1,7E-09
ENSMUST00000146552.7	-	-	-7,89	3,2E-06

Table 3 presents the list of mouse differentially expressed transcripts three months after irradiation with DS proton beam and compared to non-irradiated mouse group. Twelve genes showed two isoforms: Casr, Casc4, Evi2, Hdx, Marveld2, Olfr1258, Retreg2, Serpina3m, Sla, Ubp1, Vmn1r220 and Wdr61.

Protein-protein interactions of regulated genes



String© protein-protein interaction analysis revealed that 31 of the 140 and 25 of the 167 genes regulated, after irradiation with PBS (Figure 3A) and DS (Figure 3B) proton beam respectively, were functionally related. However, none of the regulated genes were common between the two type of irradiation.

GO-term enrichment of differentially expressed genes

Table 4. Go Terms Enrichment of differentially expressed genes after PBS irradiation.

Biological Process (GO)			
GO-term	description	count in gene set	false discovery rate
GO:0042633	hair cycle	7 of 95	0.0032
GO:0008544	epidermis development	10 of 237	0.0032
GO:0043588	skin development	9 of 220	0.0035
Molecular Function (GO)			
GO-term	description	count in gene set	false discovery rate
GO:0005198	structural molecule activity	20 of 546	2.40e-08
Cellular Component (GO)			
GO-term	description	count in gene set	false discovery rate
GO:0005882	intermediate filament	26 of 120	1.65e-29

GO:0045111	intermediate filament cytoskeleton	27 of 158	1.47e-28
GO:0099513	polymeric cytoskeletal fiber	29 of 581	5.32e-17
GO:0099512	supramolecular fiber	30 of 809	2.25e-14
GO:0045095	keratin filament	11 of 43	3.95e-13
GO:0044430	cytoskeletal part	31 of 1460	5.53e-09
GO:0005856	cytoskeleton	34 of 1933	6.68e-08
GO:0043232	intracellular non-membrane-bounded organelle	43 of 3809	9.94e-05
GO:0005903	brush border	6 of 133	0.0035

Table 5. Go Terms Enrichment of differentially expressed genes after DS irradiation.

Biological Process (GO)			
GO-term	description	count in gene set	false discovery rate
Molecular Function (GO)			
GO-term	description	count in gene set	false discovery rate
GO:0005515	protein binding	58 of 6456	0.0319
GO:0005488	binding	83 of 10884	0.0469
Cellular Component (GO)			
GO-term	description	count in gene set	false discovery rate
GO:0044464	cell part	101 of 14017	0.0043
GO:0044424	intracellular part	93 of 12219	0.0043
GO:0043231	intracellular membrane-bounded organelle	76 of 9088	0.0043
GO:0043229	intracellular organelle	85 of 10645	0.0043
GO:0043227	membrane-bounded organelle	80 of 9775	0.0043
GO:0043226	organelle	87 of 10897	0.0043
GO:0005623	cell	101 of 14044	0.0043
GO:0005622	intracellular	94 of 12462	0.0043
GO:0097135	cyclin E2-CDK2 complex	2 of 2	0.0084
GO:0005634	nucleus	54 of 6086	0.0087
GO:0005737	cytoplasm	76 of 9909	0.0192
GO:0044444	cytoplasmic part	62 of 7673	0.0267
GO:0044425	membrane part	50 of 5857	0.0349
GO:0016020	membrane	60 of 7460	0.0349

Analysis of Go terms enrichments also confirmed the presence of two very different regulated gene profiles. While genes regulated after irradiation with PBS proton beam were centered on

skin development and more precisely the formation of keratin (Table 4), those regulated after DS proton beam were less precise and localized mainly at the organelle level (Table 5).

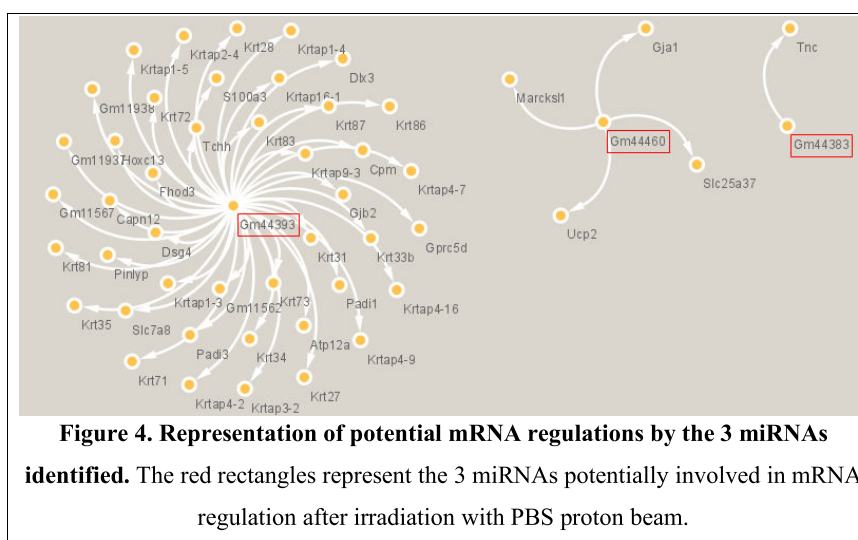
Potential interactions between regulated gene mRNAs and non-coding RNAs

Table 6. Theoretical hybridization energy required to form ncRNA-mRNA pairs.

Query	Length_Query	Target	Length_Target	dG	ndG
Gm44393	138	Krtap1-4	593	-19.08	-0,2
Gm44393	138	Slc7a8	4084	-20.67	-0,2
Gm44393	138	Hoxc13	2461	-19.52	-0,2
Gm44393	138	Krtap1-5	1041	-18.17	-0,2
Gm44393	138	Krtap4-16	954	-17.41	-0,2
Gm44393	138	Krt31	1581	-19.17	-0,2
Gm44393	138	Krt34	1609	-19.17	-0,2
Gm44393	138	Krtap4-7	984	-17.81	-0,2
Gm44393	138	Krt28	1624	-20.46	-0,2
Gm44393	138	Krtap16-1	1888	-18.65	-0,2
Gm44393	138	Krtap4-9	1059	-18.71	-0,2
Gm44393	138	Capn12	3040	-21.05	-0,2
Gm44393	138	Dlx3	2607	-21.23	-0,2
Gm44393	138	Krtap4-2	974	-18.20	-0,2
Gm44393	138	Gm11938	663	-20.76	-0,2
Gm44393	138	Gm11562	817	-20.77	-0,2
Gm44393	138	Krtap2-4	828	-20.77	-0,2
Gm44393	138	Gm11937	396	-20.77	-0,2
Gm44393	138	Gprc5d	1317	-14.67	-0,2
Gm44393	138	Gjb2	2406	-17.81	-0,2
Gm44393	138	Krtap9-3	759	-20.79	-0,2
Gm44393	138	Pinlyp	843	-19.13	-0,2
Gm44393	138	Gm11567	1043	-18.79	-0,2
Gm44460	129	Ucp2	1116	-18.97	-0,2
Gm44393	138	Krt35	1722	-20.46	-0,2
Gm44460	129	Marcks1	1605	-19.99	-0,2
Gm44393	138	Krtap3-2	1031	-18.26	-0,2
Gm44460	129	Gja1	3071	-17.45	-0,2
Gm44393	138	Krtap1-3	879	-21.63	-0,2
Gm44383	129	Tnc	7100	-19.86	-0,2
Gm44393	138	Dsg4	3478	-24.15	-0,2
Gm44393	138	Padi1	3754	-20.22	-0,2
Gm44393	138	Atp12a	3950	-25.21	-0,2
Gm44393	138	Padi3	3072	-24.83	-0,2
Gm44393	138	Cpm	5195	-19.25	-0,2

Gm44393	138	Krt27	1550	-22.84	-0,2
Gm44393	138	Tchh	5823	-29.20	-0,2
Gm44393	138	Krt33b	1581	-19.68	-0,2
Gm44393	138	S100a3	712	-19.14	-0,2
Gm44393	138	Fhod3	4956	-30.56	-0,2
Gm44460	129	Slc25a37	5927	-23.27	-0,3
Gm44393	138	Krt87	2278	-57.09	-0,4
Gm44393	138	Krt72	1953	-60.81	-0,5
Gm44393	138	Krt83	1757	-60.84	-0,5
Gm44393	138	Krt81	1843	-61.96	-0,5
Gm44393	138	Krt86	1963	-61.96	-0,5
Gm44393	138	Krt71	2186	-61.62	-0,5
Gm13032	2001	Padi1	3754	-1344.53	-0,7
Gm44393	138	Krt73	2168	-93.22	-0,7

No non-coding RNA passed filtering after irradiation with DS proton beam ($|FC| > 2$, $p\text{-adj} < 0.05$); ending the analysis of interaction with regulated mRNAs. In contrast, 14 non-coding RNAs were identified after irradiation with PBS proton beam. The combined analysis of the correlation of expression levels and theoretical required hybridization energy led to identify 49 potential mRNA-ncRNA pairs.



Among the 14 ncRNAs differentially expressed, 3 ncRNAs (Gm44393, Gm44460 and Gm44383) were identified as potential mRNA regulators (Figure 4). Gm44393, Gm44460 and

Gm44383 belong all to miRNAs class. Gm44393 should be implicated in 43 of the 49 potentially regulation identified

Keratinization as a major actor of the late effects observed with PBS?

Table 7. Go Terms Enrichment of putative Gm44393 linked DEGs.

Biological Process (GO)			
GO-term	description	count in gene set	false discovery rate
GO:0042633	hair cycle	5 of 95	0.0017
GO:1905867	epididymis development	2 of 4	0.0092
GO:0043588	skin development	5 of 220	0.0092
GO:0036414	histone citrullination	2 of 5	0.0092
GO:0001942	hair follicle development	4 of 84	0.0092
GO:0008544	epidermis development	5 of 237	0.0109
Molecular Function (GO)			
GO-term	description	count in gene set	false discovery rate
GO:0005198	structural molecule activity	13 of 546	1.31e-08
GO:0004668	protein-arginine deiminase activity	2 of 5	0.0062
GO:0005243	gap junction channel activity	2 of 14	0.0176
Cellular Component (GO)			
GO-term	description	count in gene set	false discovery rate
GO:0005882	intermediate filament	16 of 120	2.49e-22
GO:0045095	keratin filament	9 of 43	5.16e-14
GO:0099512	supramolecular fiber	17 of 809	1.01e-11
GO:0044430	cytoskeletal part	17 of 1460	5.53e-08
GO:0005856	cytoskeleton	17 of 1933	2.95e-06
GO:0043232	intracellular non-membrane-bounded organelle	18 of 3809	0.0059
GO:0005922	connexin complex	2 of 20	0.0095

GO terms enrichment analysis of the 43 genes potentially regulated by Gm44393 miRNA confirmed the impact of PBS irradiation on keratin formation pathway.

Discussion

This study aims to assess possible differences in the transcriptomic response of skin in C57Bl6 mice after TBI irradiation by active or passive proton beams at the sublethal dose of 6 Gy

compared to unirradiated mice. Indeed, few studies have been performed on transcription after these 2 delivery techniques and even less on normal tissues. At the clinical level, Matsubara *et al.* have shown that beam scanning was not always favorable in patients treated for breast cancer by carbon ions (Matsubara *et al.* 2018).

All irradiated mice (active and passive scanning) gained weight during the 3 months of breeding (Fig. 1), which confirms that the chosen TBI sub-lethal dose of 6 Gy is adequate to see the appearance of late effects. Indeed, weight loss is a side effect widely described for a very long time in irradiated mice as TBI cause digestive system failure (Bacq *et al.* 1966). The lower weight gain observed after passive proton beam irradiation could indicate that scattered beam was less well tolerated by the mice.

The study of DEGs 3 months after irradiation makes it possible to identify impairs in gene expression. The total number of DEGs was relatively close, 140 and 167 genes were differentially expressed after active and passive scanning compared to unirradiated, respectively (Fig 2). On the other hand, concerning the identified ncRNAs, no transcripts could be identified after passive scanning compared to unirradiated. This absence of regulators testifies to the proximity of the expression profiles between unirradiated mice and mice irradiated with passive scanning. We should think that major part of the DEGs would be common to the 2 types of irradiation (Fig 2). However, a single gene is commonly DE, i.e. RIKEN cDNA 9930021J03. In the literature, a study on human lung epithelial cells exposed to active or proton beams before the Bragg peak has also shown that transcription profiles were completely different between both techniques (Daila S. Gridley *et al.* 2015).

This first clear difference in DEGs (Tables 2 and Table 3) could have its origin in the physicochemical properties of the 2 types of irradiations. Indeed, if the protons are identical and the doses equivalent from a physical point of view, their mode of delivery is different. Passive delivery result in an increase in the lateral dose upstream of the tumor and active scanning leads to strong differences in dose delivery (time, dose rate, fractionation) between the distal and the proximal layers (De Marzi 2016; Wang 2015).

Secondarily, the DEGs after passive scanning do not seem to react to a particular stimulus as evidenced by the absence of GO terms enrichment in the biological process category (Table 5). These results highlight again the relatively close profiles between irradiated mice and unirradiated controls. On the other hand, it is very clear that skin cells of mice irradiated with a proton beam actively scanned continue to respond to particular stimuli inducing an activation of the synthesis of 17 cytoskeletal and cuticular keratins of type I and II (Table 2 and Table 4) three months after the irradiation. These results should be waited as irradiation is known to

induce acute keratin gene expression impair (Nanashima et al. 2012). But we could expect three months after irradiation a return to basal state of keratinocyte with an expression of Keratin 5. Instead of that, Kr6 and Kr16 are overexpressed highlighting that keratinocyte activation is occurring and due to cutaneous late damage still under wounding (Freedberg et al. 2001).

After analysis of potential interactions between DEGs transcripts and DE ncRNAs, 3 miRNAs were highlighted: Gm44393, Gm44460 and Gm44383 (Table 6). Gm44393 appears to be of interest as it appears to interact with 43 of the 49 identified DEGs transcripts (Fig 4). The miRNA Gm44393 appears to target genes of keratinization pathway (Table 7). Strategies based on miRNA expression modulation are promising tools to new treatment protocols. Jiang et. al have discovered a specific miRNA pattern expression in psoriatic epidermis. Indeed, miR-486-3p is not expressed allowing Keratin 17 protein overexpression and leading to the pathogenesis of psoriasis. miRNA Gm44393 activation specifically after active scanning proton beam irradiation is a step forward in fundamental knowledge of healthy tissue recovery and bring new perspectives on the modulation of PT cutaneous side effects.

To conclude, this study highlights at the transcriptomic level great differences in skin response three months after irradiation. Profiles of DEGs are very distinct. After passive proton beam, mRNAs expression is slightly different from control and no differences could be observed in ncRNAs. In the other hand, active scanning leads to an overexpression of mRNAs related to keratin and putative miRNAs keratin regulators. These findings point out the absolute need to adapt the PT protocols according to the type of delivery.

References

- Acharya, Sanket S., Wojciech Fendler, Jacqueline Watson, Abigail Hamilton, Yunfeng Pan, Emily Gaudiano, Patryk Moskwa, et al. 2015. « Serum MicroRNAs Are Early Indicators of Survival after Radiation-Induced Hematopoietic Injury ». *Science Translational Medicine* 7 (287): 287ra69-287ra69. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa6593>.
- Aypar, Umut, William F. Morgan, et Janet E. Baulch. 2011. « Radiation-Induced Epigenetic Alterations after Low and High LET Irradiations ». *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 707 (1-2): 24-33. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2010.12.003>.

- Bacq, Z. M, et Peter Alexander. 1966. *Fundamentals of Radiobiology*. <http://site.ebrary.com/id/10954532>.
- Baluchamy, Sudhakar, Ye Zhang, Prabakaran Ravichandran, Vani Ramesh, Ayodotun Sodipe, Joseph C. Hall, Olufisayo Jejelowo, Daila S. Gridley, Honglu Wu, et Govindarajan T. Ramesh. 2010. « Differential Oxidative Stress Gene Expression Profile in Mouse Brain after Proton Exposure ». *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal* 46 (8): 718-25. <https://doi.org/10.1007/s11626-010-9330-2>.
- Belli, Mauro, et Maria Antonella Tabocchini. 2020. « Ionizing Radiation-Induced Epigenetic Modifications and Their Relevance to Radiation Protection ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (17): 5993. <https://doi.org/10.3390/ijms21175993>.
- Bolger, Anthony M., Marc Lohse, et Bjoern Usadel. 2014. « Trimmomatic: A Flexible Trimmer for Illumina Sequence Data ». *Bioinformatics* 30 (15): 2114-20. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
- Bölling, Tobias, Julia Weege, Hans Theodor Eich, Beate Timmermann, Frank-Michal Meyer, Christian Rube, Rolf-Dieter Kortmann, et al. 2015. « Acute and Late Side Effects to Salivary Glands and Oral Mucosa after Head and Neck Radiotherapy in Children and Adolescents. Results of the “Registry for the Evaluation of Side Effects after Radiotherapy in Childhood and Adolescence”: Side Effects after Head and Neck Radiotherapy in Children ». *Head & Neck* 37 (8): 1137-41. <https://doi.org/10.1002/hed.23715>.
- Carthew, Richard W., et Erik J. Sontheimer. 2009. « Origins and Mechanisms of MiRNAs and SiRNAs ». *Cell* 136 (4): 642-55. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035>.
- Cellini, Francesco, Alessio Morganti, Domenico Genovesi, Nicola Silvestris, et Vincenzo Valentini. 2014. « Role of MicroRNA in Response to Ionizing Radiations: Evidences and Potential Impact on Clinical Practice for Radiotherapy ». *Molecules* 19 (4): 5379-5401. <https://doi.org/10.3390/molecules19045379>.
- Chang, J., W. Feng, Y. Wang, Y. Luo, A. R. Allen, I. Koturbash, J. Turner, et al. 2015. « Whole-Body Proton Irradiation Causes Long-Term Damage to Hematopoietic Stem Cells in Mice ». *Radiat Res* 183 (2): 240-48. <https://doi.org/10.1667/RR13887.1>.
- Chaudhry, M. Ahmad. 2014. « Radiation-Induced MicroRNA: Discovery, Functional Analysis, and Cancer Radiotherapy: RADIATION-INDUCED MiRNA ». *Journal of Cellular Biochemistry* 115 (3): 436-49. <https://doi.org/10.1002/jcb.24694>.
- Chaudhry, M. Ahmad, Bridget Kreger, et Romaica A. Omaruddin. 2010. « Transcriptional Modulation of Micro-RNA in Human Cells Differing in Radiation Sensitivity ».

- International Journal of Radiation Biology* 86 (7): 569-83.
<https://doi.org/10.3109/09553001003734568>.
- De Marzi, Ludovic. 2016. « Effets physiques et biologiques des faisceaux de protons balayés : mesures et modélisation pour des balayages séquentiels à haut débit ». Theses, Université Paris Saclay (COMUE). <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01447662>.
- El Bezawy, Rihan, Stella Tinelli, Monica Tortoreto, Valentina Doldi, Valentina Zuco, Marco Folini, Claudio Stucchi, et al. 2019. « MiR-205 Enhances Radiation Sensitivity of Prostate Cancer Cells by Impairing DNA Damage Repair through PKC ϵ and ZEB1 Inhibition ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 38 (1): 51. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1060-z>.
- Fabian, Marc Robert, Nahum Sonenberg, et Witold Filipowicz. 2010. « Regulation of mRNA Translation and Stability by MicroRNAs ». *Annual Review of Biochemistry* 79 (1): 351-79. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060308-103103>.
- Freedberg, Irwin M., Marjana Tomic-Canic, Mayumi Komine, et Miroslav Blumenberg. 2001. « Keratins and the keratinocyte activation cycle ». *Journal of Investigative Dermatology* 116 (5): 633-40. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2001.01327.x>.
- Gao, Feng, Pengyuan Liu, Jayashree Narayanan, Meiyang Yang, Brian L. Fish, Yong Liu, Mingyu Liang, Elizabeth R. Jacobs, et Meetha Medhora. 2017. « Changes in MiRNA in the Lung and Whole Blood after Whole Thorax Irradiation in Rats ». *Scientific Reports* 7 (1): 44132. <https://doi.org/10.1038/srep44132>.
- Ghosh, Sanchita P., Rupak Pathak, Parameet Kumar, Shukla Biswas, Sharmistha Bhattacharyya, Vidya P. Kumar, Martin Hauer-Jensen, et Roopa Biswas. 2016. « Gamma-Tocotrienol Modulates Radiation-Induced MicroRNA Expression in Mouse Spleen ». *Radiation Research* 185 (5): 485. <https://doi.org/10.1667/RR14248.1>.
- Gong, Pijun, Tingting Zhang, Dalin He, et Jer-Tsong Hsieh. 2015. « MicroRNA-145 Modulates Tumor Sensitivity to Radiation in Prostate Cancer ». *Radiation Research* 184 (6): 630. <https://doi.org/10.1667/RR14185.1>.
- Goodhead, Dudley T. 2010. « New Radiobiological, Radiation Risk and Radiation Protection Paradigms ». *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 687 (1-2): 13-16. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2010.01.006>.
- Green, Daniel M., Thomas E. Merchant, Catherine A. Billups, Dennis C. Stokes, Alberto Broniscer, Ute Bartels, Murali Chintagumpala, et al. 2015. « Pulmonary Function after Treatment for Embryonal Brain Tumors on SJMB03 that Included Craniospinal

- Irradiation ». *International journal of radiation oncology, biology, physics* 93 (1): 47-53. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2015.05.019>.
- Gridley, D. S., T. L. Freeman, A. Y. Makinde, A. J. Wroe, X. Luo-Owen, J. Tian, X. W. Mao, et al. 2011. « Comparison of Proton and Electron Radiation Effects on Biological Responses in Liver, Spleen and Blood ». *Int J Radiat Biol* 87 (12): 1173-81. <https://doi.org/10.3109/09553002.2011.624393>.
- Gridley, Daila S., Michael J. Pecaut, Xiao W. Mao, Andrew J. Wroe, et Xian Luo-Owen. 2015. « Biological Effects of Passive Versus Active Scanning Proton Beams on Human Lung Epithelial Cells ». *Technology in Cancer Research & Treatment* 14 (1): 81-98. <https://doi.org/10.7785/tcrt.2012.500392>.
- Gunther, Jillian R., Mariko Sato, Murali Chintagumpala, Leena Ketonen, Jeremy Y. Jones, Pamela K. Allen, Arnold C. Paulino, et al. 2015. « Imaging Changes in Pediatric Intracranial Ependymoma Patients Treated With Proton Beam Radiation Therapy Compared to Intensity Modulated Radiation Therapy ». *International Journal of Radiation Oncology*Biolog*Physics* 93 (1): 54-63. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2015.05.018>.
- Halimi, Mohammad, S. Mohsen Asghari, Reyhaneh Sariri, Dariush Moslemi, et Hadi Parsian. 2012. « Cellular Response to Ionizing Radiation: A MicroRNA Story ». *International Journal of Molecular and Cellular Medicine* 1 (4): 178-84.
- Jiang, Man, Zhongbin Sun, Erle Dang, Bing Li, Hui Fang, Junqin Li, Lin Gao, Kaiming Zhang, et Gang Wang. 2017. « TGF b / SMAD / microRNA-486-3p Signaling Axis Mediates Keratin 17 Expression and Keratinocyte Hyperproliferation in Psoriasis ». *Journal of Investigative Dermatology* 137 (10): 2177-86. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.06.005>.
- Khan, Shahid Yar, Muhammad Akram Tariq, James Patrick Perrott, Christopher Drew Brumbaugh, Hyunsung John Kim, Muhammad Imran Shabbir, Govindarajan T. Ramesh, et Nader Pourmand. 2013. « Distinctive MicroRNA Expression Signatures in Proton-Irradiated Mice ». *Molecular and Cellular Biochemistry* 382 (1-2): 225-35. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1738-z>.
- Laurent, Carine. 2018. « Oxidative Stress in Hadrontherapy ». *Novel Prospects in Oxidative and Nitrosative Stress*, mai. <https://doi.org/10.5772/intechopen.73238>.
- Li, Jianwei, Wei Ma, Pan Zeng, Junyi Wang, Bin Geng, Jichun Yang, et Qinghua Cui. 2015. « LncTar: A Tool for Predicting the RNA Targets of Long Noncoding RNAs ». *Briefings in Bioinformatics* 16 (5): 806-12. <https://doi.org/10.1093/bib/bbu048>.

- Li, Xiang Hong, Cam T. Ha, Dadin Fu, et Mang Xiao. 2012. « Micro-RNA30c Negatively Regulates REDD1 Expression in Human Hematopoietic and Osteoblast Cells after Gamma-Irradiation ». *PLOS ONE* 7 (11): e48700. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048700>.
- Lomax, A J. 2008. « Intensity modulated proton therapy and its sensitivity to treatment uncertainties 2: the potential effects of inter-fraction and inter-field motions ». *Physics in Medicine and Biology* 53 (4): 1043-56. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/53/4/015>.
- MacDonald, Shannon M, Rachel Jimenez, Peter Paetzold, Judith Adams, Jonathan Beatty, Thomas F DeLaney, Hanne Kooy, Alphonse G Taghian, et Hsiao-Ming Lu. 2013. « Proton Radiotherapy for Chest Wall and Regional Lymphatic Radiation; Dose Comparisons and Treatment Delivery ». *Radiation Oncology* 8 (1): 71. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-8-71>.
- Mao, X. W., L. M. Green, T. Mekonnen, N. Lindsey, et D. S. Gridley. 2010. « Gene Expression Analysis of Oxidative Stress and Apoptosis in Proton-Irradiated Rat Retina ». *In Vivo* 24 (4): 425-30.
- Matsubara, Hiroaki, Kumiko Karasawa, Wataru Furuichi, Mitsuji Wakaisami, Shintaro Shiba, Masaru Wakatsuki, Tokuhiko Omatsu, Taku Inaniwa, Shigekazu Fukuda, et Tadashi Kamada. 2018. « Comparison of passive and scanning irradiation methods for carbon-ion radiotherapy for breast cancer ». *Journal of Radiation Research* 59 (5): 625-31. <https://doi.org/10.1093/jrr/rry052>.
- Mering, C. v. 2003. « STRING: a database of predicted functional associations between proteins ». *Nucleic Acids Research* 31 (1): 258-61. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg034>.
- Metheetrairut, Chanatip, et Frank J Slack. 2013. « MicroRNAs in the Ionizing Radiation Response and in Radiotherapy ». *Current Opinion in Genetics & Development* 23 (1): 12-19. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2013.01.002>.
- Nanashima, Naoki, Koichi Ito, Takashi Ishikawa, Manabu Nakano, et Toshiya Nakamura. 2012. « Damage of hair follicle stem cells and alteration of keratin expression in external radiation-induced acute alopecia ». *International Journal of Molecular Medicine* 30 (3): 579-84. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.1018>.
- Nielsen, Steffen, Niels Bassler, Leszek Grzanka, Louise Laursen, Jan Swakon, Pawel Olko, Christian Nicolaj Andreassen, Jan Alsner, et Brita Singers Sørensen. 2019. « Comparison of Coding Transcriptomes in Fibroblasts Irradiated With Low and High LET Proton Beams and Cobalt-60 Photons ». *International Journal of Radiation*

- Oncology*Biography*Physics* 103 (5): 1203-11.
<https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2018.11.065>.
- Patro, Rob, Geet Duggal, Michael I Love, Rafael A Irizarry, et Carl Kingsford. 2017. « Salmon Provides Fast and Bias-Aware Quantification of Transcript Expression ». *Nature Methods* 14 (4): 417-19. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4197>.
- Roberts, C J, G R Morgan, et N Danford. 1997. « Effect of Hormones on the Variation of Radiosensitivity in Females as Measured by Induction of Chromosomal Aberrations. » *Environmental Health Perspectives* 105 (suppl 6): 1467-71. <https://doi.org/10.1289/ehp.97105s61467>.
- Robinson, M. D., D. J. McCarthy, et G. K. Smyth. 2010. « EdgeR: A Bioconductor Package for Differential Expression Analysis of Digital Gene Expression Data ». *Bioinformatics* 26 (1): 139-40. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>.
- Robinson, Mark D, et Alicia Oshlack. 2010. « A Scaling Normalization Method for Differential Expression Analysis of RNA-Seq Data ». *Genome Biology* 11 (3): R25. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-3-r25>.
- Wagner-Ecker, Mechthild, Christian Schwager, Ute Wirkner, Amir Abdollahi, et Peter E Huber. 2010. « MicroRNA Expression after Ionizing Radiation in Human Endothelial Cells ». *Radiation Oncology* 5 (1): 25. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-5-25>.
- Wang, Dongxu. 2015. « A critical appraisal of the clinical utility of proton therapy in oncology ». *Medical Devices (Auckland, N.Z.)* 8 (octobre): 439-46. <https://doi.org/10.2147/MDER.S65594>.
- Yock, T. I., B. Y. Yeap, D. H. Ebb, E. Weyman, B. R. Eaton, N. A. Sherry, R. M. Jones, et al. 2016. « Long-Term Toxic Effects of Proton Radiotherapy for Paediatric Medulloblastoma: A Phase 2 Single-Arm Study ». *Lancet Oncol* 17 (3): 287-98. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00167-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00167-9).

DISCUSSION GENERALE

Le traitement des cancers par RT repose sur la toxicité des RI. Ces RI vont ainsi induire des lésions conduisant à la mort cellulaire. L'objectif est de cibler principalement les tissus tumoraux. Cependant, les techniques d'irradiation font que les tissus sains peuvent recevoir des doses non-négligeables y compris dans le cas de la PT. Les effets secondaires engendrés, notamment les plus invalidants : les effets tardifs (cf. Chapitre 2, 2.2. p.54), sont présents dans 5 à 10% des cas ce qui représente entre 9.000 et 18.000 patients chaque année en France.

La PT, du fait de sa balistique, présente un intérêt particulier en oncopédiatrie puisqu'elle pourrait permettre d'épargner les tissus sains : les OAR présents autour de la tumeur. Ainsi, pour les tumeurs intracrâniennes, la PT pourrait diminuer certains effets délétères tels que les baisses des capacités cognitives, de la fonction endocrine et de l'audition. L'EBR des protons est considérée comme identique à celle des photons puisque ce ne sont pas des rayonnements à haut TEL. L'intérêt de la PT réside donc dans le profil de distribution de la dose. Cependant, les études sont encore assez peu nombreuses et le recul sur la technique est encore faible : les études actuelles ont une période de suivi assez courte après PT. Il existe donc un fort besoin d'identifier les potentiels effets secondaires de la PT, de les étudier et de les comprendre.

Comme expliqué précédemment (cf. Chapitre 2, 3.1. p.59), la proportion de toxicités observées après PT semble être la même qu'après RT conventionnelle. Certaines études montrent même une diminution de la toxicité après PT *versus* RT (Romesser et al. 2016; Yock et al. 2014; Kahalley et al. 2016; Eaton et al. 2016; Viswanathan, Pradhan, et Eugster 2011; Song et al. 2014; Grant et al. 2015). Cependant, certaines études cliniques menées en protonthérapie pédiatrique, pour la plupart aux Etats-Unis, ont montré une toxicité plus importante qu'en RT (y compris par modulation d'intensité) (Green et al. 2015; Gunther et al. 2015; Bölling et al. 2015).

Il apparaît donc ainsi que l'EBR, calculée la plupart du temps sur des critères de survie *in vitro* et notamment prise en compte dans les TPS, ne peut pas répondre à toutes les questions. Ghirdani *et al.* proposent d'ailleurs un nouveau paradigme mettant en avant l'importance de l'étude des réponses cellulaires et tissulaires spécifiques des protons telles que les lésions complexes de l'ADN, l'expression différentielle des gènes, la modulation épigénétique et l'induction de voies de signalisation (Girdhani, Sachs, et Hlatky 2013).

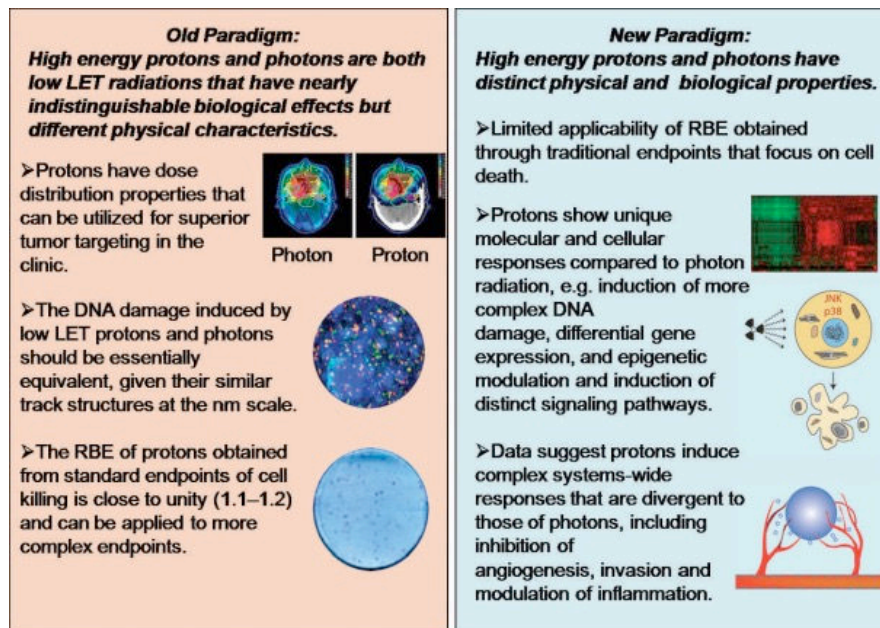


Figure 41. Schéma des anciens et nouveaux paradigmes de la radiobiologie des protons proposé par Ghirdani et al. 2013

De plus, la plus ancienne technique de délivrance de la dose en PT, la diffusion passive, conduit à une dose excessive dans les tissus sains au niveau latéral en amont de la tumeur. Les nouvelles modalités de délivrance de la dose par le balayage du faisceau, qui sont en plein essor, aboutissent au fait que les différentes couches tissulaires traversées par l'irradiation ne sont pas irradiées de la même manière : pas le même débit de dose, pas la même durée ni le même (micro)fractionnement. En effet, la pellicule distale recevra la dose en une seule fois à un débit de dose très élevé (des dizaines de Gy/s) alors que la pellicule proximale recevra la même dose en de nombreuses fois en plusieurs minutes (Cf Etude biblio Chap 2 p.X) (Figure 42).

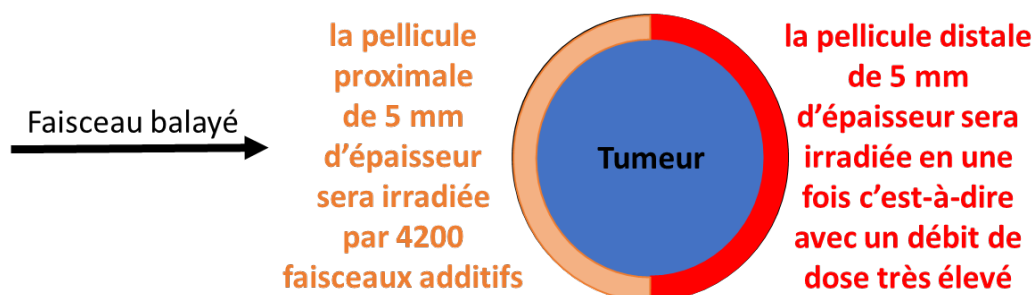


Figure 42. Schéma représentant l'irradiation d'une tumeur sphérique de 10 cm de diamètre traitée par un faisceau balayé (voxel de 5 mm x 5 mm x 5 mm).

Il n'y a que très peu d'études réellement comparatives sur les effets biologiques sur les tissus sains des faisceaux de protons balayés et diffusés. Une étude clinique effectuée au Japon (HIMAC, Chiba) sur 11 patientes traitées pour un cancer du sein par des faisceaux d'ions carbone diffusés ou balayés a montré que le balayage n'est pas toujours favorable (Figure 43) (Matsubara et al. 2018)

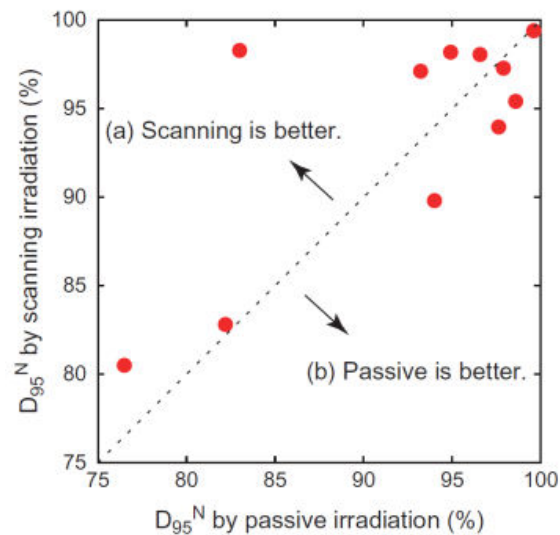


Figure 43. Graphique représentant la D_{95}^N , c'est-à-dire la dose délivrée à 95% du PTV (Planning Target Volume : volume-cible planifié) et normalisée à cause de la variété des doses prescrites pour les différentes patientes (points rouges). D'après (Matsubara et al. 2018).

Les analyses statistiques menées par Matsubara *et al.* montrent que le balayage de faisceau n'est pas supérieur dans cette étude : $p = 0.58$ (test de Wilcoxon).

Nos travaux cherchent donc à améliorer la compréhension des mécanismes conduisant aux effets secondaires sur les tissus sains de la RT conventionnelle et de la PT par faisceaux balayés ou diffusés. Cette meilleure compréhension est la clé pour identifier les cibles qui permettront de prévenir mais aussi d'intervenir sur ces effets secondaires radioinduits. Ces connaissances peuvent aussi offrir des pistes d'amélioration des traitements par RT et par PT.

Les voies étudiées au cours de cette thèse sont celles qui participent à l'apparition des effets tardifs de l'irradiation : 1) le stress oxydatif (lésions des macromolécules biologiques et capacité antioxydante) qui peut se produire par vagues entretenues jusqu'à des temps très tardifs après l'irradiation (Laurent, Voisin, et Pouget 2006; Laurent, Pouget, et Voisin 2005) et qui peut entraîner une sénescence prématurée des cellules, 2) la génotoxicité qui peut là aussi

entraîner une létalité à long terme par mort mitotique des cellules des tissus à renouvellement lent, 3) l'inflammation qui peut participer à l'entretien du stress oxydatif et aux effets bystander sur les tissus sains. Mais nous avons aussi cherché à découvrir d'éventuelles nouvelles voies qui seraient différenciellement exprimées selon la modalité d'administration de la dose : faisceaux balayés ou diffusés de protons. Pour cela, une étude transcriptomique a été mise en place permettant d'évaluer la transcription des ARN messagers mais aussi des ARN non-codants (ARNnc). De plus, parmi les ARNnc, les micro-ARN ont déjà montré leur intérêt après irradiation (pour revue, (Belli et Tabocchini 2020; Wei et al. 2019).

Les cellules et tissus étant composés en majorité d'eau, leur irradiation induit la production d'ERO et d'ERN (Espèces Réactives de l'azote) (Vorotnikova et al. 2010; Wei et al. 2019). Ces ERO vont induire d'une part des lésions au niveau des protéines, des lipides et de l'ADN mais peuvent également être impliquées dans l'activation des voies de transduction et des facteurs de transcription jouant un rôle dans la réponse à l'irradiation (Jiang et al. 2014). Le système rédox oxydation/réduction a en effet montré son implication dans les diverses lésions observées après irradiation (Spitz et al. 2004). Il apparaît immédiatement après l'irradiation mais il peut être aussi maintenu et est directement relié aux régulations épigénétiques et peut réguler l'expression des miARN (Jiang et al. 2014; Chaouni et al. 2020). L'origine du déséquilibre de ce système peut provenir directement de l'irradiation mais peut donc provenir des régulations épigénétiques et également des phénomènes inflammatoires. Il peut être responsable de l'apparition des effets tardifs comme l'inflammation, les effets bystander ou la fibrose (Jiang et al. 2014; Chaouni et al. 2020).

Nos résultats semblent confirmer que les voies de génotoxicité, de stress oxydatif et d'inflammation sont bien impliquées dans les effets secondaires observés à long terme après RT conventionnelle ou PT.

Comme montré dans l'article n°1 (Chaouni et al. 2020) sur le sang des patients traités par RT conventionnelle entre 2006 et 2016, il existe des différences, sans irradiation *ex vivo*, entre les patients présentant des fortes toxicités cutanées tardives (grades 3 et 4 du RTOG/EORTC) *versus* ceux en présentant pas ou peu (grades 0, 1 et 2 du RTOG/EORTC) avec une tendance à une diminution de la capacité antioxydante (-9% d'activité SOD, -17% d'activité catalase et -14% d'activité GPx), une tendance à une faible augmentation de l'oxydation des protéines (+4%) et des lipides (+3%), une tendance à une augmentation de l'inflammation (+140% d'IL-

8) et une augmentation du TGF- β 1(+32%) notamment impliqué dans les processus de réparation tissulaire tels que la fibrose.

De même, l'article n°2 montre la persistance (ou production de *novo*) de lésions de l'ADN, des lipides et des protéines et une tendance à une augmentation de la capacité antioxydante dans des proportions variables selon les tissus et selon la méthode de délivrance du faisceau de protons 3 mois après irradiation corps entier dans des modèles murins.

L'article n°3 montre pourtant que ces voies (génotoxicité, stress oxydatif, inflammation) ne semblent pas spécifiquement régulées au niveau transcriptionnel après PT quelle que soit la modalité de délivrance du faisceau : balayé ou diffusé. En effet, les résultats de transcriptomique montrent qu'il n'y a pas de changement d'expression d'un facteur supérieur à 2 concernant les gènes impliqués dans les phénomènes oxydatifs et inflammatoires ou les lésions de l'ADN et leur réparation. Cela tend à montrer que ces voies sont modulées à un autre niveau : modifications post-transcriptionnelles, traductionnelles, post-traductionnelles... Pour ce qui concerne les enzymes antioxydantes par exemple, leur activité peut être modifiée non seulement par leur synthèse et leur dégradation, mais aussi par la concentration en substrat ou cofacteur (inhibition en cas d'excès), par des inhibiteurs ou des activateurs agissant par divers mécanismes, par l'environnement (pH, température, solvant, environnement oxydant ou réducteur...), par la localisation de l'enzyme, etc.

Les articles n°2 et n°3 montrent aussi l'impact du mode de délivrance des faisceaux de protons puisque de nombreuses variations sont observées entre ces 2 modalités au niveau des biomarqueurs testés : micronoyaux, activités SOD, GPx et CAT, niveau de GSSG, peroxydation lipidique, carbonylation des protéines, régulation de l'expression des ARNm et des ARNnc, interactions potentielles ARNm-ARNnc et identification des gènes potentiellement régulés par les ARNnc.

Il apparaît alors que le mode de délivrance des protons par le balayage du faisceau, même s'il ne conduit pas à une variation au niveau de la survie des souris, semble entraîner, de manière générale, une augmentation de la fréquence des micronoyaux, de l'activité GPx, de la carbonylation des protéines et du niveau des cytokines IL1- α et TNF- α . Cependant, nous avons observé de grandes disparités de réponse selon l'organe considéré (sang, poumons, cœur, peau), avec, par exemple, une plus forte peroxydation lipidique érythrocytaire et cardiaque. Il semble

donc primordial de prendre en compte, via des études de chaque tissu potentiellement traversé, les spécificités des tissus sains rencontrés au cours d'un traitement par PT.

L'étude transcriptomique de la peau met en avant d'autres voies après PT dans les modèles murins. La voie de la kératinisation semble ainsi prépondérante après un faisceau de protons balayés. La kératinisation correspond à la différenciation des kératinocytes (90% de l'épiderme) en couche cornée. Les kératines ont plusieurs rôles au niveau architectural afin notamment de pouvoir répondre à un stress mécanique, mais aussi sur l'activité mitotique des cellules épithéliales, les voies de signalisation, la différenciation, l'apoptose, la synthèse protéique et la cicatrisation (pour revue, (Deo et Deshmukh 2018)). L'hyperkératinisation, observée après PBS, est généralement liée à des phénomènes chroniques et provient d'une prolifération des cellules épithéliales.

L'étude plus précise des ARNnc représente un intérêt majeur. En effet, on considère qu'au moins 98% de l'ADN est non-codant. Les ARN résultant de ces ADNnc peuvent réguler les ARNm en les inhibant ou en les dégradant (Figure 44).

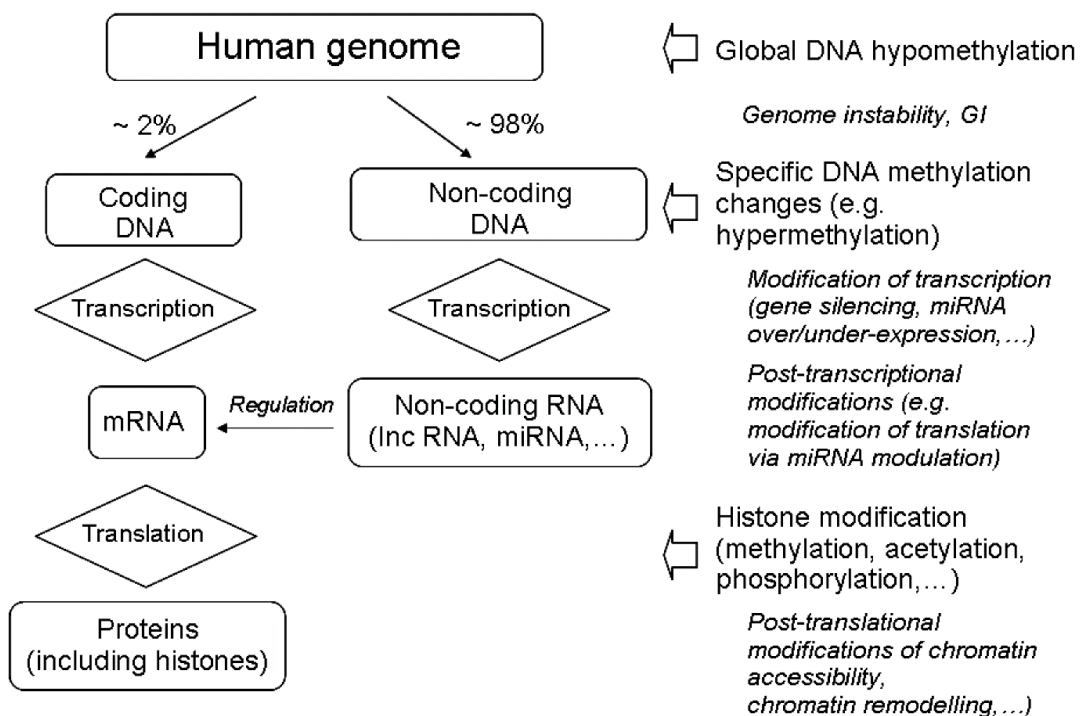


Figure 44. Mécanismes épigénétiques conduisant du génome aux protéines. D'après (Belli et Tabocchini 2020).

Notre étude a ainsi mis en avant 14 ARNnc régulés différemment après irradiation par un faisceau balayé alors qu'aucun ARNnc n'est différemment régulé après un faisceau passif. Les interactions potentielles de ces 14 ARNnc avec les ARNm ont été étudiées car elles peuvent conduire à des régulations des ARNm sur lesquels ils s'hybrident. Au final, 49 paires sont possibles avec un ARNnc principalement impliqué : le miARN Gm44393, qui est responsable à lui seul de 43 des 49 paires possibles. Là encore, les 43 gènes potentiellement régulés par ce miARN sont reliés à la voie de kératinisation. Cette voie apparaît donc prépondérante après un faisceau de protons balayé, ce qui n'est pas du tout le cas avec le faisceau diffusé.

De plus, après irradiation, le rôle des miARN sur la production d'ERO et le stress oxydatif a été démontré (pour revue, Wei et al. 2019). En effet, certains miARN inhibent les enzymes antioxydantes conduisant alors à une surproduction d'anions superoxyde. Par exemple, c'est le cas du miARN miR-21, dont la transcription est activée par TGF- β , qui inhibe la SOD2 (Jiang et al. 2014; Farhood et al. 2019). Cependant, dans nos travaux, nous n'observons pas de variations de ces miARN. Cela est à relier au fait que nous n'observons pas de diminution de l'activité des enzymes antioxydantes mais, au contraire, une augmentation dans la peau des souris irradiées en protons balayés ou diffusés (article n°2).

L'expression des miARN pourrait aussi servir à la prédiction des effets secondaires comme cela a déjà été montré chez des babouins concernant le syndrome hématologique aigu et tardif radio-induit (Port et al. 2016; 2017).

Il pourrait donc s'avérer d'un grand intérêt d'évaluer l'expression des miARN impliqués dans les phénomènes oxydatifs, mais aussi des miRNA impliqués dans les voies de kératinisation chez l'homme, chez les patients dans un but de prédiction des effets secondaires de la RT, et surtout de la PT étant donné les résultats que nous avons obtenus concernant la différence de réponse PBS/DS. L'article n°1 montre d'ailleurs chez le patient l'importance des phénomènes oxydatifs puisqu'ils permettent de différencier les patients ayant présenté peu/pas de toxicités cutanées tardives de ceux qui ont présenté de fortes toxicités cutanées tardives après RT. D'autres biomarqueurs ont permis de différencier ces patients : la génotoxicité, l'inflammation et l'apoptose. Nos résultats concernant l'apoptose sont en accord avec ceux de l'équipe du Pr Azria : l'irradiation *ex vivo* chez les patients les plus radiosensibles induit une diminution du taux d'apoptose lymphocytaire. Concernant les autres biomarqueurs, une diminution de la fréquence des micronoyaux, de la capacité antioxydante et de la carbonylation des protéines et

une augmentation du TNF- α , de l'IL-8 et du TGF- β 1 chez les patients les plus radiosensibles ont été observées suggérant que ces patients présentent une diminution des mécanismes de défenses entraînant une diminution de la détoxification des ERO. La diminution de la fréquence des micronoyaux pourrait s'expliquer par une réparation de l'ADN conduisant à des structures fautives et donc à un plus petit nombre de micronoyaux mais aussi à de potentiels effets stochastiques. Après PT, il serait intéressant d'étudier ces biomarqueurs ainsi que les profils de miARN circulants pour, là aussi, tenter de différencier les patients plus ou moins radiosensibles, mais aussi pour évaluer l'éventuelle différence de réponse entre les patients traités par des faisceaux balayés ou diffusés. Il faudrait pour cela établir des critères d'inclusion clairs : même localisation tumorale, même tranche d'âge etc.

Le taux de réussite d'un traitement par RT conventionnelle ou par PT est en effet conditionné par la réponse des tissus sains aux rayonnements ionisants, dépendant notamment de la radiosensibilité interindividuelle (Domina, Philchenkov, et Dubrovskaja 2018). Cette radiosensibilité peut influencer le protocole du traitement, le pronostic ainsi que la survie des patients (Wei et al. 2019). L'objectif donc est de développer un biomarqueur ou un pool de biomarqueurs afin de prédire l'apparition des effets secondaires qui surviennent dans les tissus sains, on pourrait alors parler de traitement de radiothérapie personnalisé par la biologie « biology-driven personalized radiation treatment » (Domina, Philchenkov, et Dubrovskaja 2018).

CONCLUSIONS-PERSPECTIVES

Les résultats de ces travaux de thèse ont permis de répondre aux questions posées :

- Y a-t-il des différences de réponse à long terme en ce qui concerne les biomarqueurs étudiés entre les patients présentant pas ou peu de toxicité et ceux présentant une forte toxicité cutanée tardive après RT conventionnelle ?

Oui, il existe, encore des années après irradiation, des différences de réponses dans le sang irradié *ex vivo* : les patients présentant les plus forts grades de toxicité cutanée tardive ont une plus faible apoptose et fréquence de micronoyaux lymphocytaires, une plus faible activité des enzymes antioxydantes érythrocytaires, un plus bas niveau de glutathion et de carbonylation des protéines au niveau érythrocytaire, et un plus fort taux de TNF- α , d'IL-8 et de TGF- β 1 plasmatique. Mais, il existe aussi dans le sang non-irradié des différences de réponse entre les patients présentant des fortes toxicités cutanées tardives et ceux en présentant pas ou peu avec une tendance à une diminution de la capacité antioxydante, une tendance à une augmentation de l'oxydation des protéines et des lipides, une tendance à une augmentation de l'inflammation et une augmentation du TGF- β 1.

- Peut-on mettre en évidence un ou un groupe de biomarqueurs sanguins dont les variations après irradiation *ex vivo* permettraient de discriminer au sein d'une population traitée par RT les individus dits radiosensibles, présentant d'importantes séquelles cutanées, du reste de la population ?

Oui, nous avons pu mettre en évidence plusieurs biomarqueurs, en plus de l'apoptose lymphocytaire déjà évaluée par l'équipe du Pr Azria, qu'il faudrait désormais tester de manière prospective : la fréquence de micronoyaux lymphocytaire, l'activité SOD érythrocytaire et le niveau de TGF- β 1 plasmatique. L'utilisation d'un pool de biomarqueurs, via une modélisation, pourrait permettre de mieux affiner la prédiction de l'apparition des effets secondaires chez les patients traités par RT afin d'éviter que certains échappent à la règle comme c'est encore souvent le cas.

- Existe-t-il encore à long terme après l'irradiation par des faisceaux de protons une différence entre les souris irradiées ou non-irradiées en terme de stress oxydatif, de génotoxicité, d'inflammation et de transcriptomique dans les tissus sains ? Si oui, quels sont les biomarqueurs les plus pertinents et, donc, les voies à étudier en priorité ?

Oui, nos travaux montrent qu'il existe, encore à long terme après irradiation par des protons, des lésions de l'ADN, des lipides et des protéines et une tendance à une augmentation de la

capacité antioxydante comparativement aux souris non-irradiées. Les proportions sont variables selon les tissus. De plus amples études paraissent donc nécessaires concernant les voies mises en avant dans les différents organes. Au niveau transcriptomique, des gènes sont différenciellement exprimés à long terme dans la peau mais ils sont très différents selon la modalité de délivrance du faisceau : la technique passive semble se rapprocher plus du niveau basal.

- Existe-t-il une différence de réponse à l'irradiation des tissus sains entre les 2 types de délivrance des faisceaux de protons : PBS et DS ? Si oui, quels sont les biomarqueurs dont les mesures diffèrent et quelles sont les voies à étudier ?

Oui, nos résultats montrent que de nombreuses variations sont observées entre ces 2 modalités au niveau des biomarqueurs testés : micronoyaux, activités SOD, GPx et CAT, niveau de GSSG, peroxydation lipidique, carbonylation des protéines, régulation de l'expression des ARNm et des ARNnc, interactions potentielles ARNm-ARNnc et identification des gènes potentiellement régulés par les ARNnc. Tous ces biomarqueurs devraient être étudiés plus amplement sachant qu'ils varient, non seulement selon la méthode de délivrance du faisceau de protons, mais aussi selon les tissus.

De plus amples études sont donc nécessaires pour mieux comprendre la toxicité de la protonthérapie. Celle-ci reste peu étudiée du fait du faible nombre de centres de ressource en hadronthérapie dans le monde. Par ailleurs, il paraît également important de pouvoir comparer ces effets à ceux de la radiothérapie conventionnelle. C'est pourquoi des irradiations aux RX (prévues dans le cadre de ce projet mais reportées pour cause de crise sanitaire liée au Covid-19) sont programmées.

La prédiction des effets secondaires pour chacun des patients traités par RT conventionnelle ou protonthérapie serait d'un intérêt majeur afin d'adapter le protocole de traitement et/ou de prévenir les effets délétères liés à l'irradiation des tissus sains ou aux phénomènes bystander. L'amélioration de ces prédictions semble passer par la prise en compte de la spécificité de chaque organe et de chaque patient. Des pistes pourront être évaluées telle que l'utilisation d'antioxydants qui ont déjà montré leur efficacité (en combinaison ou non) pour réduire les toxicités à long terme sur les tissus sains (Nuszkiewicz, Woźniak, et Szewczyk-Golec 2020; Delanian et al. 2003; Delanian, Depondt, et Lefaix 2005; Laurent, Voisin, et Pouget 2006;

Laurent, Pouget, et Voisin 2005; Chiao et Lee 2005) . Ce genre de stratégies pourrait se révéler d'un intérêt majeur afin de préserver les tissus sains au cours ou après PT.

Nos résultats montrent aussi que la technique de délivrance des faisceaux est importante à prendre en compte notamment pour les effets aux tissus sains (article n°2 et (Matsubara et al. 2018)). Ainsi, le balayage de faisceau n'est pas toujours avantageux, il paraît donc nécessaire d'optimiser les TPS.

D'autre part, les inconvénients des protons, ou même des ions carbone, peuvent conduire à chercher d'autres ions pour les traitements par les hadrons. Ainsi, les ions hélium (même TEL que les protons mais EBR plus élevée) pourraient présenter un intérêt particulier puisque leur propriétés physiques et biologiques (particules plus lourdes que les protons mais plus légères que les ions carbone) leur permettent de mieux se conformer à la tumeur tout en épargnant mieux les tissus sains. Pour tous ces ions, des études précliniques sont nécessaires afin de déterminer les effets biologiques précoces et tardifs liés à l'étalement du pic de Bragg (SOBP), au TEL, à la distribution de la dose, au fractionnement, au mode de délivrance etc.

Les traitements combinés pourraient aussi se révéler une bonne stratégie pour améliorer le ratio thérapeutique. Mais là aussi, leur toxicité sur les tissus sains est peu étudiée. C'est pourquoi le projet ToxiP3 a été lancé par le laboratoire. Il vise à évaluer la toxicité des traitements combinés par inhibiteurs de PARP et photons ou protons balayés dans le même modèle de souris que celui utilisé au cours de ce doctorat.

Pour conclure, les avantages des hadrons sont souvent mis en avant : leur EBR serait plus élevée sur les tissus tumoraux et moindre sur les tissus sains. Mais il apparaît que nous devrions porter une attention particulière aux effets secondaires des hadrons car quelques études récentes ont montré une forte augmentation du stress oxydant dans des cellules normales après exposition à des ions carbone (Dettmerring et al. 2015; C. Laurent et al. 2013), mais aussi à des protons (Chang et al. 2015; Chmielewski et al. 2016).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abratt, Raymond P., et Graeme W. Morgan. 2002. « Lung Toxicity Following Chest Irradiation in Patients with Lung Cancer ». *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 35 (2): 103-9. [https://doi.org/10.1016/s0169-5002\(01\)00334-8](https://doi.org/10.1016/s0169-5002(01)00334-8).

Acharya, Sanket S., Wojciech Fendler, Jacqueline Watson, Abigail Hamilton, Yunfeng Pan, Emily Gaudiano, Patryk Moskwa, et al. 2015. « Serum MicroRNAs Are Early Indicators of Survival after Radiation-Induced Hematopoietic Injury ». *Science Translational Medicine* 7 (287): 287ra69-287ra69. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa6593>.

Ainsbury, Bakhanova E, Barquinero Jf, Brai M, Chumak V, Correcher V, Darroudi F, et al. 2011. « Review of Retrospective Dosimetry Techniques for External Ionising Radiation Exposures ». *Radiation Protection Dosimetry. Radiat Prot Dosimetry.* novembre 2011. <https://doi.org/10.1093/rpd/ncq499>.

Alam, Israt S., Mubarik A. Arshad, Quang-Dé Nguyen, et Eric O. Aboagye. 2015. « Radiopharmaceuticals as Probes to Characterize Tumour Tissue ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 42 (4): 537-61. <https://doi.org/10.1007/s00259-014-2984-3>.

Alamil, Héléna, Laurence Galanti, Natacha Heutte, Marie Van Der Schueren, Zeina Dagher, et Mathilde Lechevrel. 2020. « Genotoxicity of Aldehyde Mixtures: Profile of Exocyclic DNA-Adducts as a Biomarker of Exposure to Tobacco Smoke ». *Toxicology Letters* 331 (octobre): 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.05.010>.

Ando, K., S. Koike, K. Nojima, Y. J. Chen, C. Ohira, S. Ando, N. Kobayashi, T. Ohbuchi, W. Shimizu, et T. Kanai. 1998. « Mouse Skin Reactions Following Fractionated Irradiation with Carbon Ions ». *International Journal of Radiation Biology* 74 (1): 129-38. <https://doi.org/10.1080/095530098141799>.

Andreassen, Christian Nicolaj, Jens Overgaard, et Jan Alsner. 2013. « Independent Prospective Validation of a Predictive Test for Risk of Radiation Induced Fibrosis Based on the Gene Expression Pattern in Fibroblasts Irradiated in Vitro ». *Radiotherapy and Oncology* 108 (3): 469-72. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.08.029>.

Anscher, M. S., F. M. Kong, K. Andrews, R. Clough, L. B. Marks, G. Bentel, et R. L. Jirtle. 1998. « Plasma Transforming Growth Factor Beta1 as a Predictor of Radiation Pneumonitis ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 41 (5): 1029-35.

Antocchia, Antonio, Antonella Sgura, Francesco Berardinelli, Maria Cavinato, Roberto Cherubini, Silvia Gerardi, et Caterina Tanzarella. 2009. « Cell Cycle Perturbations and Genotoxic Effects in Human Primary Fibroblasts Induced by Low-Energy Protons and X/Gamma-Rays ». *Journal of Radiation Research* 50 (5): 457-68. <https://doi.org/10.1269/jrr.09008>.

Armanious, Merna A., Homan Mohammadi, Sara Khodor, Daniel E. Oliver, Peter A. Johnstone, et Michael G. Fradley. 2018. « Cardiovascular Effects of Radiation Therapy ». *Current Problems in Cancer* 42 (4): 433-42. <https://doi.org/10.1016/j.currproblcancer.2018.05.008>.

Ashikawa, J. K., C. A. Sondhaus, C. A. Tobias, L. L. Kayfetz, S. O. Stephens, et M. Donovan. 1967. « Acute Effects of High-Energy Protons and Alpha Particles in Mice ». *Radiation Research. Supplement* 7: 312-24.

Ashwell, Susan, et Sonya Zabudoff. 2008. « DNA Damage Detection and Repair Pathways—Recent Advances with Inhibitors of Checkpoint Kinases in Cancer Therapy ». *Clinical Cancer Research* 14 (13): 4032-37. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-5138>.

Azria, D., O. Riou, F. Castan, T.D. Nguyen, K. Peignaux, C. Lemanski, J.L. Lagrange, et al. 2015. « Radiation-induced CD8 T-lymphocyte Apoptosis as a Predictor of Breast Fibrosis After Radiotherapy: Results of the Prospective Multicenter French Trial ». *EBioMedicine* 2: 1965-73.

<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.10.024>.

Azzam, Edouard I., Jean-Paul Jay-Gerin, et Debkumar Pain. 2012. « Ionizing Radiation-Induced Metabolic Oxidative Stress and Prolonged Cell Injury ». *Cancer Letters* 327 (1-2): 48-60. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.12.012>.

Baarli, J., et P. Bonet Maury. 1965. « RELATIVE BIOLOGICAL EFFECTIVENESS OF 592-MEV PROTONS ON MICE ». *Nature* 205 (janvier): 361-64. <https://doi.org/10.1038/205361a0>.

Bacq, Z. M, et Peter Alexander. 1966. *Fundamentals of Radiobiology*. <http://site.ebrary.com/id/10954532>.

Badie, C, S Dziwura, C Raffy, T Tsigani, G Alsbeih, J Moody, P Finnon, E Levine, D Scott, et S Bouffler. 2008. « Aberrant CDKN1A transcriptional response associates with abnormal sensitivity to radiation treatment ». *British Journal of Cancer* 98 (11): 1845-51. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604381>.

Baerlocher, Gabriela M., Irma Vulto, Gary de Jong, et Peter M. Lansdorp. 2006. « Flow Cytometry and FISH to Measure the Average Length of Telomeres (Flow FISH) ». *Nature Protocols* 1 (5): 2365-76. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.263>.

Bajpayee, Mahima, Ashutosh Kumar, et Alok Dhawan. 2019. « The Comet Assay: Assessment of In Vitro and In Vivo DNA Damage ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 2031: 237-57. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9646-9_12.

Baluchamy, Prabakaran Ravichandran, Vani Ramesh, Zhenhua He, Ye Zhang, Joseph C. Hall, Olufisayo Jejelowo, Daila S. Gridley, Honglu Wu, et Govindarajan T. Ramesh. 2012. « Reactive Oxygen Species Mediated Tissue Damage in High Energy Proton Irradiated Mouse Brain ». *Molecular and Cellular Biochemistry* 360 (1-2): 189-95. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-1056-2>.

Baluchamy, Sudhakar, Ye Zhang, Prabakaran Ravichandran, Vani Ramesh, Ayodotun Sodipe, Joseph C. Hall, Olufisayo Jejelowo, Daila S. Gridley, Honglu Wu, et Govindarajan T. Ramesh. 2010. « Differential Oxidative Stress Gene Expression Profile in Mouse Brain after Proton Exposure ». *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal* 46 (8): 718-25. <https://doi.org/10.1007/s11626-010-9330-2>.

Barber, J. B., W. Burrill, A. R. Spreadborough, E. Levine, C. Warren, A. E. Kiltie, S. A. Roberts, et D. Scott. 2000. « Relationship between in Vitro Chromosomal Radiosensitivity of Peripheral Blood Lymphocytes and the Expression of Normal Tissue Damage Following Radiotherapy for Breast Cancer ». *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 55 (2): 179-86.

Barford, David. 2004. « The Role of Cysteine Residues as Redox-Sensitive Regulatory Switches ». *Current Opinion in Structural Biology* 14 (6): 679-86. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2004.09.012>.

Barker, Holly E., James T. E. Paget, Aadil A. Khan, et Kevin J. Harrington. 2015. « The Tumour Microenvironment after Radiotherapy: Mechanisms of Resistance and Recurrence ». *Nature Reviews. Cancer* 15 (7): 409-25. <https://doi.org/10.1038/nrc3958>.

Barnett, Gillian C., Rebecca M. Elliott, Jan Alsner, Christian N. Andreassen, Osama Abdelhay, Neil G. Burnet, Jenny Chang-Claude, et al. 2012. « Individual Patient Data Meta-Analysis Shows No Association between the SNP Rs1800469 in TGFB and Late Radiotherapy Toxicity ». *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 105 (3): 289-95. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2012.10.017>.

Barshishat-Kupper, Michal, Elizabeth A. McCart, James G. Freedy, Ashlee J. Tipton, Vitaly Nagy,

- Sung-Yop Kim, Michael R. Landauer, Gregory P. Mueller, et Regina M. Day. 2015. « Protein Oxidation in the Lungs of C57BL/6J Mice Following X-Irradiation ». *Proteomes* 3 (3): 249-65. <https://doi.org/10.3390/proteomes3030249>.
- Barshishat-Kupper, Michal, Ashlee J. Tipton, Elizabeth A. McCart, Jeffrey McCue, Gregory P. Mueller, et Regina M. Day. 2014. « Effect of Ionizing Radiation on Liver Protein Oxidation and Metabolic Function in C57BL/6J Mice ». *International Journal of Radiation Biology* 90 (12): 1169-78. <https://doi.org/10.3109/09553002.2014.930536>.
- Baskar, R., K. Lee, R. Yeo, et K.W. Yeoh. 2012. « Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions ». *International Journal of Medical Sciences* 9: 193-99. <https://doi.org/10.7150/ijms.3635>.
- Belli, D. Bettega, P. Calzolari, F. Cera, R. Cherubini, M. Dalla Vecchia, M. Durante, et al. 2000. « Inactivation of Human Normal and Tumour Cells Irradiated with Low Energy Protons ». *International Journal of Radiation Biology* 76 (6): 831-39.
- Belli, F. Cera, R. Cherubini, F. Ianzini, G. Moschini, O. Saporà, G. Simone, M. A. Tabocchini, et P. Tiveron. 1994. « DNA Double-Strand Breaks Induced by Low Energy Protons in V79 Cells ». *International Journal of Radiation Biology* 65 (5): 529-36. <https://doi.org/10.1080/09553009414550621>.
- Belli, et Maria Antonella Tabocchini. 2020. « Ionizing Radiation-Induced Epigenetic Modifications and Their Relevance to Radiation Protection ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (17): 5993. <https://doi.org/10.3390/ijms21175993>.
- Berardinelli, F., A. Antoccia, R. Cherubini, V. De Nadal, S. Gerardi, C. Tanzarella, et A. Sgura. 2011. « Telomere Alterations and Genomic Instability in Long-Term Cultures of Normal Human Fibroblasts Irradiated with X Rays and Protons ». *Radiation Protection Dosimetry* 143 (2-4): 274-78. <https://doi.org/10.1093/rpd/ncq486>.
- Bergonié, J., et L. Tribondeau. 2003. « Interpretation of Some Results from Radiotherapy and an Attempt to Determine a Rational Treatment Technique. 1906 ». *The Yale Journal of Biology and Medicine* 76 (4-6): 181-82.
- Bergqvist, Michael, Daniel Brattström, Malin Ståhlberg, Hamid Vaghef, Ola Brodin, et Björn Hellman. 1998. « Evaluation of Radiation-Induced DNA Damage and DNA Repair in Human Lung Cancer Cell Lines with Different Radiosensitivity Using Alkaline and Neutral Single Cell Gel Electrophoresis ». *Cancer Letters* 133 (1): 9-18. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(98\)00178-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(98)00178-5).
- Bhargava, Ragini, David O. Onyango, et Jeremy M. Stark. 2016. « Regulation of Single-Strand Annealing and Its Role in Genome Maintenance ». *Trends in Genetics: TIG* 32 (9): 566-75. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.06.007>.
- Bishop, Andrew J., Brad Greenfield, Anita Mahajan, Arnold C. Paulino, M. Fatih Okcu, Pamela K. Allen, Murali Chintagumpala, et al. 2014. « Proton beam therapy versus conformal photon radiation therapy for childhood craniopharyngioma: multi-institutional analysis of outcomes, cyst dynamics, and toxicity ». *International journal of radiation oncology, biology, physics* 90 (2): 354-61. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2014.05.051>.
- Björk-Eriksson, Thomas, et Bengt Glimelius. 2005. « The Potential of Proton Beam Radiation Therapy in Breast Cancer ». *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)* 44 (8): 884-89. <https://doi.org/10.1080/02841860500355918>.
- Bolger, Anthony M., Marc Lohse, et Bjoern Usadel. 2014. « Trimmomatic: A Flexible Trimmer for Illumina Sequence Data ». *Bioinformatics* 30 (15): 2114-20.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.

Bölling, Tobias, Julia Weege, Hans Theodor Eich, Beate Timmermann, Frank-Michal Meyer, Christian Rube, Rolf-Dieter Kortmann, et al. 2015. « Acute and Late Side Effects to Salivary Glands and Oral Mucosa after Head and Neck Radiotherapy in Children and Adolescents. Results of the “Registry for the Evaluation of Side Effects after Radiotherapy in Childhood and Adolescence” ». *Head & Neck* 37 (8): 1137-41. <https://doi.org/10.1002/hed.23715>.

Boonla, Chanchai. 2018. « Oxidative Stress in Urolithiasis ». *Reactive Oxygen Species (ROS) in Living Cells*, mai. <https://doi.org/10.5772/intechopen.75366>.

Bordón, Elisa, Luis Alberto Henríquez Hernández, Pedro C Lara, Beatriz Pinar, Fausto Fontes, Carlos Rodríguez Gallego, et Marta Lloret. 2009. « Prediction of Clinical Toxicity in Localized Cervical Carcinoma by Radio-Induced Apoptosis Study in Peripheral Blood Lymphocytes (PBLs) ». *Radiation Oncology* 4 (1): 58. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-4-58>.

Bourhis, Jens Overgaard, Hélène Audry, Kian K. Ang, Michele Saunders, Jacques Bernier, Jean-Claude Horiot, et al. 2006. « Hyperfractionated or Accelerated Radiotherapy in Head and Neck Cancer: A Meta-Analysis ». *Lancet (London, England)* 368 (9538): 843-54. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)9121-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)9121-6).

Bourhis, Wibault P, Lusinchi A, Bobin S, Luboinski B, et Eschwege F. 1997. « Status of Accelerated Fractionation Radiotherapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. » *Current Opinion in Oncology* 9 (3): 262-66. <https://doi.org/10.1097/00001622-199709030-00008>.

Bourton, Emma C., Piers N. Plowman, Daniel Smith, Colin F. Arlett, et Christopher N. Parris. 2011. « Prolonged Expression of the γ -H2AX DNA Repair Biomarker Correlates with Excess Acute and Chronic Toxicity from Radiotherapy Treatment ». *International Journal of Cancer* 129 (12): 2928-34. <https://doi.org/10.1002/ijc.25953>.

Bowen, Stephen R, Albert J van der Kogel, Marianne Nordmark, Søren M Bentzen, et Robert Jeraj. 2011. « Characterization of PET hypoxia tracer uptake and tissue oxygenation via electrochemical modeling ». *Nuclear medicine and biology* 38 (6): 771-80. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2011.02.002>.

Bradley, F. J., J. A. Watson, D. P. Doolittle, A. Brodsky, et R. B. Sutton. 1964. « RBE OF 440-MEV PROTON RADIATION COMPARED TO 125 KVP X-RAYS FOR LD-50(30) OF MICE ». *Health Physics* 10 (février): 71-73.

Brown, J. M. 2000. « Exploiting the Hypoxic Cancer Cell: Mechanisms and Therapeutic Strategies ». *Molecular Medicine Today* 6 (4): 157-62. [https://doi.org/10.1016/s1357-4310\(00\)01677-4](https://doi.org/10.1016/s1357-4310(00)01677-4).

Buckton, G.E Hamilton, L Paton, et A.O Langlands. 1978. *Chromosome aberrations in irradiated ankylosing spondylitis patients*. United Kingdom. <https://inis.iaea.org/search/searchsinglelrecord.aspx?recordsFor=SingleRecord&RN=10426283>.

Budagov, R. S., et L. P. Ul'ianova. 2000. « Comparative analysis of proinflammatory cytokines in plasma of mice exposed to radiation or in combined radiation injury ». *Radiatsionnaia Biologiia, Radioecologiia* 40 (2): 188-91.

Burnet, N. G., J. Nyman, I. Turesson, R. Wurm, J. R. Yarnold, et J. H. Peacock. 1992. « Prediction of Normal-Tissue Tolerance to Radiotherapy from in-Vitro Cellular Radiation Sensitivity ». *Lancet (London, England)* 339 (8809): 1570-71.

Bush, David A., Gregory Cheek, Salman Zaheer, Jason Wallen, Hamid Mirshahidi, Ari Katerelos, Roger Grove, et Jerry D. Slater. 2013. « High-Dose Hypofractionated Proton Beam Radiation Therapy Is Safe

and Effective for Central and Peripheral Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer: Results of a 12-Year Experience at Loma Linda University Medical Center ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 86 (5): 964-68. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2013.05.002>.

Bush, David A., Sharon Do, Sharon Lum, Carlos Garberoglio, Hamid Mirshahidi, Baldev Patyal, Roger Grove, et Jerry D. Slater. 2014. « Partial Breast Radiation Therapy with Proton Beam: 5-Year Results with Cosmetic Outcomes ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 90 (3): 501-5. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2014.05.1308>.

Bush, David A., Jason C. Smith, Jerry D. Slater, Michael L. Volk, Mark E. Reeves, Jason Cheng, Roger Grove, et Michael E. de Vera. 2016. « Randomized Clinical Trial Comparing Proton Beam Radiation Therapy with Transarterial Chemoembolization for Hepatocellular Carcinoma: Results of an Interim Analysis ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 95 (1): 477-82. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2016.02.027>.

Cadet, S. Bellon, T. Douki, S. Frelon, D. Gasparutto, E. Muller, J.P. Pouget, J.L. Ravanat, A. Romieu, et S. Sauvaigo. 2004. « Radiation-Induced DNA Damage: Formation, Measurement, and Biochemical Features ». *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology: Official Organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer* 23: 33-43.

Cadet, Jean, Kelvin J. A. Davies, Marisa Hg Medeiros, Paolo Di Mascio, et J. Richard Wagner. 2017. « Formation and Repair of Oxidatively Generated Damage in Cellular DNA ». *Free Radical Biology & Medicine* 107: 13-34. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.049>.

Cai, Xu-Wei, Kerby A. Shedden, Shang-Hu Yuan, Mary A. Davis, Lu-Ying Xu, Cong-Ying Xie, Xiao-Long Fu, Theodore S. Lawrence, David M. Lubman, et Feng-Ming Spring Kong. 2011. « Baseline Plasma Proteomic Analysis to Identify Biomarkers That Predict Radiation-Induced Lung Toxicity in Patients Receiving Radiation for Non-Small Cell Lung Cancer ». *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 6 (6): 1073-78. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3182152ba6>.

Cai, Xu-Wei, Kerby Shedden, Xiaoping Ao, Mary Davis, Xiao-Long Fu, Theodore S. Lawrence, David M. Lubman, et Feng-Ming Spring Kong. 2010. « Plasma Proteomic Analysis May Identify New Markers for Radiation-Induced Lung Toxicity in Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 77 (3): 867-76. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.01.038>.

Callén, Elsa, Mila Jankovic, Nancy Wong, Shan Zha, Hua-Tang Chen, Simone Difilippantonio, Michela Di Virgilio, et al. 2009. « Essential role for DNA-PKcs in DNA double strand break repair and apoptosis in ATM deficient lymphocytes ». *Molecular cell* 34 (3): 285-97. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.04.025>.

Calugaru, Valentin. 2011. « Efficacité biologique relative (EBR) des faisceaux de protons utilisés en radiothérapie ». Phdthesis, Université Paris Sud - Paris XI. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00769946/document>.

Calugaru, Valentin, Catherine Nauraye, Georges Noël, Nicole Giocanti, Vincent Favaudon, et Frédérique Mégnin-Chanet. 2011. « Radiobiological Characterization of Two Therapeutic Proton Beams with Different Initial Energy Spectra Used at the Institut Curie Proton Therapy Center in Orsay ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 81 (4): 1136-43. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.09.003>.

Carr, Anitra, et Balz Frei. 1999. « Does Vitamin C Act as a Pro-Oxidant under Physiological Conditions? » *The FASEB Journal* 13 (9): 1007-24. <https://doi.org/10.1096/fasebj.13.9.1007>.

Carthew, Richard W., et Erik J. Sontheimer. 2009. « Origins and Mechanisms of MiRNAs and SiRNAs ». *Cell* 136 (4): 642-55. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035>.

Cellini, Francesco, Alessio Morganti, Domenico Genovesi, Nicola Silvestris, et Vincenzo Valentini. 2014. « Role of MicroRNA in Response to Ionizing Radiations: Evidences and Potential Impact on Clinical Practice for Radiotherapy ». *Molecules* 19 (4): 5379-5401. <https://doi.org/10.3390/molecules19045379>.

Chang, Wei Feng, Yingying Wang, Yi Luo, Antiño R. Allen, Igor Koturbash, Jennifer Turner, et al. 2015. « Whole-Body Proton Irradiation Causes Long-Term Damage to Hematopoietic Stem Cells in Mice ». *Radiation research* 183 (2): 240-48. <https://doi.org/10.1667/RR13887.1>.

Chang, Foster D. Lasley, Indra J. Das, Marc S. Mendonca, et Joseph R. Dynlacht. 2014. « Oxygen Effect, Relative Biological Effectiveness and Linear Energy Transfer ». In *Basic Radiotherapy Physics and Biology*, édité par David S. Chang, Foster D. Lasley, Indra J. Das, Marc S. Mendonca, et Joseph R. Dynlacht, 235-40. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-06841-1_22.

Chang, Shimin, Liang Hu, Yipu Xu, Xiangchun Li, Linsha Ma, Xiaoyu Feng, Jingsong Wang, Chunmei Zhang, et Songlin Wang. 2019. « Inorganic Nitrate Alleviates Total Body Irradiation-Induced Systemic Damage by Decreasing Reactive Oxygen Species Levels ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 103 (4): 945-57. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2018.11.021>.

Chaouni, Samia, Delphine Dumont Lecomte, Dinu Stefan, Alexandre Leduc, Victor Barraux, Alexandra Leconte, Jean-Michel Grellard, et al. 2020. « The Possibility of Using Genotoxicity, Oxidative Stress and Inflammation Blood Biomarkers to Predict the Occurrence of Late Cutaneous Side Effects after Radiotherapy ». *Antioxidants* 9 (3): 220. <https://doi.org/10.3390/antiox9030220>.

Chaudhry, M. Ahmad. 2014. « Radiation-Induced MicroRNA: Discovery, Functional Analysis, and Cancer Radiotherapy: RADIATION-INDUCED MiRNA ». *Journal of Cellular Biochemistry* 115 (3): 436-49. <https://doi.org/10.1002/jcb.24694>.

Chavaudra, Nicole, Jean Bourhis, et Nicolas Foray. 2004. « Quantified Relationship between Cellular Radiosensitivity, DNA Repair Defects and Chromatin Relaxation: A Study of 19 Human Tumour Cell Lines from Different Origin ». *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 73 (3): 373-82. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2004.07.016>.

Chen, et S. Ahmad. 2012. « Empirical Model Estimation of Relative Biological Effectiveness for Proton Beam Therapy ». *Radiation Protection Dosimetry* 149 (2): 116-23. <https://doi.org/10.1093/rpd/ncr218>.

Chen, Yuhchayau, Ollivier Hyrien, Jacqueline Williams, Paul Okunieff, Therese Smudzin, et Philip Rubin. 2005. « Interleukin (IL)-1A and IL-6: Applications to the Predictive Diagnostic Testing of Radiation Pneumonitis ». *International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics* 62 (1): 260-66. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2005.01.041>.

Chi, Cuiping, Ryoko Tanaka, Yohei Okuda, Nobuo Ikota, Haruhiko Yamamoto, Shiro Urano, Toshihiko Ozawa, et Kazunori Anzai. 2005. « Quantitative Measurements of Oxidative Stress in Mouse Skin Induced by X-Ray Irradiation ». *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 53 (11): 1411-15. <https://doi.org/10.1248/cpb.53.1411>.

Chiao, Teresa B., et Audrey J. Lee. 2005. « Role of Pentoxifylline and Vitamin E in Attenuation of Radiation-Induced Fibrosis ». *The Annals of Pharmacotherapy* 39 (3): 516-22. <https://doi.org/10.1345/aph.1E186>.

Chiu, H. J., D. A. Fischman, et U. Hammerling. 2008. « Vitamin A depletion causes oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and PARP-1-dependent energy deprivation ». *FASEB Journal* 22 (11):

3878-87.

Chmielewski, N. N., C. Caressi, E. Giedzinski, V. K. Parihar, et C. L. Limoli. 2016. « Contrasting the Effects of Proton Irradiation on Dendritic Complexity of Subiculum Neurons in Wild Type and MCAT Mice ». *Environ Mol Mutagen* 57 (5): 364-71. <https://doi.org/10.1002/em.22006>.

Choi, Changhoon, Chansu Lee, Sung-Won Shin, Shin-Yeong Kim, Sung Noh Hong, et Hee Chul Park. 2019. « Comparison of Proton and Photon Beam Irradiation in Radiation-Induced Intestinal Injury Using a Mouse Model ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (8). <https://doi.org/10.3390/ijms20081894>.

Chondrogianni, Niki, Isabelle Petropoulos, Stefanie Grimm, Konstantina Georgila, Betul Catalgol, Bertrand Friguet, Tilman Grune, et Efstathios S. Gonos. 2014. « Protein Damage, Repair and Proteolysis ». *Molecular Aspects of Medicine* 35 (février): 1-71. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.09.001>.

Choudhary, Sofiya. 2018. « Deterministic and Stochastic Effects of Radiation ». *Cancer Therapy & Oncology International Journal* 12 (2). <https://doi.org/10.19080/CTOIJ.2018.12.555834>.

Chung, Torunn I. Yock, Kerrie Nelson, Yang Xu, Nancy L. Keating, et Nancy J. Tarbell. 2013. « Incidence of Second Malignancies among Patients Treated with Proton versus Photon Radiation ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 87 (1): 46-52. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2013.04.030>.

Clapp, E. B. Darden, et M. C. Jernigan. 1974. « Relative Effects of Whole-Body Sublethal Doses of 60-MeV Protons and 300-KVp X-Rays on Disease Incidences in RF Mice ». *Radiation Research* 57 (1): 158-86.

Cleary, S. F., W. J. Geeraets, R. C. Williams, H. A. Mueller, et W. T. Ham. 1972. « X-Ray and Proton Induced Lens Changes in the Rabbit ». *Health Physics* 23 (4): 453-59. <https://doi.org/10.1097/00004032-197210000-00001>.

———. 1973. « Lens Changes in the Rabbit from Fractionated X-Ray and Proton Irradiations ». *Health Physics* 24 (3): 269-76. <https://doi.org/10.1097/00004032-197303000-00001>.

Collins, Andrew R. 2004. « The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations ». *Molecular Biotechnology* 26 (3): 249-61. <https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249>.

Constable, I. J., M. Goitein, A. M. Koehler, et R. A. Schmidt. 1976. « Small-Field Irradiation of Monkey Eyes with Protons and Photons ». *Radiation Research* 65 (2): 304-14.

Corre, Isabelle, Colin Niaudet, et Francois Paris. 2010. « Plasma Membrane Signaling Induced by Ionizing Radiation ». *Mutation Research* 704 (1-3): 61-67. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2010.01.014>.

Cosset, J. -M. 2010. « Effets secondaires des rayonnements sur les tissus sains et organes à risque ». *Cancer/Radiothérapie, Dose de tolérance à l'irradiation des tissus sains*, 14 (4): 228-31. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2010.04.004>.

Costa, Solange, Marcello Ceppi, Carla Costa, Susana Silva, Cristiana Pereira, Blanca Laffon, Stefano Bonassi, et João Paulo Teixeira. 2016. « The Cytokinesis-Block Micronucleus (CBMN) Assay in Human Populations Exposed to Styrene: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Mutation Research* 770 (Pt A): 92-105. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.06.003>.

Courtois, Christian. 2011. « Contrôle faisceau et dosimétrie en protonthérapie ». CAEN BASSE-NORMANDIE.

Cuenod, C. A., et D. Balvay. 2013. « Perfusion and Vascular Permeability: Basic Concepts and

Measurement in DCE-CT and DCE-MRI ». *Diagnostic and Interventional Imaging* 94 (12): 1187-1204. <https://doi.org/10.1016/j.diii.2013.10.010>.

Dalle-Donne, Isabella, Daniela Giustarini, Roberto Colombo, Ranieri Rossi, et Aldo Milzani. 2003. « Protein Carbonylation in Human Diseases ». *Trends in Molecular Medicine* 9 (4): 169-76. [https://doi.org/10.1016/s1471-4914\(03\)00031-5](https://doi.org/10.1016/s1471-4914(03)00031-5).

Dalrymple, G. V., I. R. Lindsay, J. J. Ghidoni, J. D. Hall, J. C. Mitchell, H. L. Kundel, et I. L. Morgan. 1966. « Some Effects of 138-Mev Protons on Primates ». *Radiation Research* 28 (2): 471-88.

Dalrymple, G. V., I. R. Lindsay, J. J. Ghidoni, J. C. Mitchell, et I. L. Morgan. 1966. « An Estimate of the Biological Effects of the Space Proton Environment ». *Radiation Research* 28 (2): 548-66.

Dalrymple, G. V., I. R. Lindsay, J. D. Hall, J. C. Mitchell, J. J. Ghidoni, H. L. Kundel, et I. L. Morgan. 1966. « The Relative Biological Effectiveness of 138-Mev Protons as Compared to Cobalt-60 Gamma Radiation ». *Radiation Research* 28 (2): 489-506.

Dalrymple, I. R. Lindsay, J. J. Ghidoni, H. L. Kundel, E. T. Still, R. Jacobs, et I. L. Morgan. 1966. « Some Effects of Whole-Body 32-Mev Proton Irradiations on Primates ». *Radiation Research* 28 (2): 406-33.

Darden, E. B., K. W. Christenberry, J. J. Beauchamp, R. S. Bender, M. C. Jernigan, J. W. Conklin, et A. C. Upton. 1970. « Comparison of 60-MeV Protons and 300-KVp x-Rays for Induction of Lens Opacities in RF Mice ». *Radiation Research* 43 (3): 598-612.

Datta, Kamal, Shubhankar Suman, Bhaskar V. S. Kallakury, et Albert J. Fornace. 2012. « Exposure to Heavy Ion Radiation Induces Persistent Oxidative Stress in Mouse Intestine ». *PLoS One* 7 (8): e42224. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042224>.

De Marzi, Ludovic. 2016. « Effets physiques et biologiques des faisceaux de protons balayés : mesures et modélisation pour des balayages séquentiels à haut débit ». Theses, Université Paris Saclay (COMUE). <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01447662>.

Decordier, Ilse, Raluca Mateuca, et Micheline Kirsch-Volders. 2011. « Micronucleus Assay and Labeling of Centromeres with FISH Technique ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 691: 115-36. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-849-2_7.

Delanian, Joel Depondt, et Jean-Louis Lefaix. 2005. « Major Healing of Refractory Mandible Osteoradionecrosis after Treatment Combining Pentoxifylline and Tocopherol: A Phase II Trial ». *Head & Neck* 27 (2): 114-23. <https://doi.org/10.1002/hed.20121>.

Delanian, R. Porcher, S. Balla-Mekias, et J.L. Lefaix. 2003. « Randomized, Placebo-Controlled Trial of Combined Pentoxifylline and Tocopherol for Regression of Superficial Radiation-Induced Fibrosis ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 21: 2545-50. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.06.064>.

Deo, Priya Nimish, et Revati Deshmukh. 2018. « Pathophysiology of keratinization ». *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP* 22 (1): 86-91. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_195_16.

Dettmering, T., S. Zahnreich, M. Colindres-Rojas, M. Durante, G. Taucher-Scholz, et C. Fournier. 2015. « Increased Effectiveness of Carbon Ions in the Production of Reactive Oxygen Species in Normal Human Fibroblasts ». *J Radiat Res* 56 (1): 67-76. <https://doi.org/10.1093/jrr/rru083>.

Di Meo, Sergio, Tanea T. Reed, Paola Venditti, et Victor Manuel Victor. 2016. « Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions ». Review Article. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi. 12 juillet 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1245049>.

- Differding, Sarah, François-Xavier Hanin, et Vincent Grégoire. 2015. « PET Imaging Biomarkers in Head and Neck Cancer ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 42 (4): 613-22. <https://doi.org/10.1007/s00259-014-2972-7>.
- Domina, Emiliya A., Alex Philchenkov, et Anna Dubrovskaya. 2018. « Individual Response to Ionizing Radiation and Personalized Radiotherapy ». *Critical ReviewsTM in Oncogenesis* 23 (1-2): 69-92. <https://doi.org/10.1615/CritRevOncog.2018026308>.
- Doorn, Jonathan A., et Dennis R. Petersen. 2003. « Covalent Adduction of Nucleophilic Amino Acids by 4-Hydroxynonenal and 4-Oxononenal ». *Chemico-Biological Interactions* 143-144 (février): 93-100. [https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(02\)00178-3](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(02)00178-3).
- Dörr, W. 2002. « Acute Radiation Effects in Normal Tissues - Translational Aspects of Biological Research ». *Normal Tissue Reactions in Radiotherapy and Oncology* 37: 1-8. <https://doi.org/10.1159/000061310>.
- Doyen, J., P. -Y. Bondiau, K. Benezery, J. Thariat, M. Vidal, A. Gérard, J. Héroult, C. Carrie, et J. -M. Hannoun-Lévi. 2016. « Indications et résultats de la protonthérapie dans le traitement des cancers ». *Cancer/Radiothérapie*, 27e Congrès national de la Société française de radiothérapie oncologique, 20 (6): 513-18. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2016.06.005>.
- Doyen, J., P. Giraud, et Y. Belkacemi. 2010. « [Normal tissue tolerance to external beam radiation therapy: cardiac structures] ». *Cancer Radiothérapie: Journal De La Societe Francaise De Radiotherapie Oncologique* 14 (4-5): 319-26. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2010.02.006>.
- Durand, Christelle. 2014. « Effet des cellules stromales mésenchymateuses (CSM) sur l'hypersensibilité viscérale chronique dans un modèle d'ulcération colique radio-induite chez le rat ». Theses, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01071193>.
- Eaton, Natia Esiashvili, Sungjin Kim, Briana Patterson, Elizabeth A. Weyman, Lauren T. Thornton, Claire Mazewski, et al. 2016. « Endocrine Outcomes with Proton and Photon Radiotherapy for Standard Risk Medulloblastoma ». *Neuro-Oncology* 18 (6): 881-87. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov302>.
- El Bezawy, Rihan, Stella Tinelli, Monica Tortoreto, Valentina Doldi, Valentina Zuco, Marco Folini, Claudio Stucchi, et al. 2019. « MiR-205 Enhances Radiation Sensitivity of Prostate Cancer Cells by Impairing DNA Damage Repair through PKC ϵ and ZEB1 Inhibition ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 38 (1): 51. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1060-z>.
- Eldabaje, Robert, Duong L. Le, Wendy Huang, et Li-Xi Yang. 2015. « Radiation-Associated Cardiac Injury ». *Anticancer Research* 35 (5): 2487-92.
- El-Zein, Randa, Anne Vral, et Carol J. Etzel. 2011. « Cytokinesis-Blocked Micronucleus Assay and Cancer Risk Assessment ». *Mutagenesis* 26 (1): 101-6. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq071>.
- Emami, B., J. Lyman, A. Brown, L. Coia, M. Goitein, J.E. Munzenrider, B. Shank, L.J. Solin, et M. Wesson. 1991. « Tolerance of Normal Tissue to Therapeutic Irradiation ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 21: 109-22. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(91\)90171-y](https://doi.org/10.1016/0360-3016(91)90171-y).
- Evans, Mark D., Miral Dizdaroglu, et Marcus S. Cooke. 2004. « Oxidative DNA Damage and Disease: Induction, Repair and Significance ». *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 567 (1): 1-61. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2003.11.001>.
- Fabian, Marc Robert, Nahum Sonenberg, et Witold Filipowicz. 2010. « Regulation of MRNA Translation and Stability by MicroRNAs ». *Annual Review of Biochemistry* 79 (1): 351-79. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060308-103103>.

- Falkmer, S., B. Larsson, et S. Stenson. 1959. « Effects of Single Dose Proton Irradiation of Normal Skin and Vx2 Carcinoma in Rabbit Ears: A Comparative Investigation with Protons and Roentgen Rays ». *Acta Radiologica* 52 (septembre): 217-34. <https://doi.org/10.3109/00016925909171641>.
- Farhood, Bagher, Nasser Hashemi Goradel, Keywan Mortezaee, Neda Khanlarkhani, Ensieh Salehi, Maryam Shabani Nashtaei, Dheyauldeen Shabeeb, Ahmed Eleojo Musa, Hengameh Fallah, et Masoud Najafi. 2019. « Intercellular Communications-Redox Interactions in Radiation Toxicity; Potential Targets for Radiation Mitigation ». *Journal of Cell Communication and Signaling* 13 (1): 3-16. <https://doi.org/10.1007/s12079-018-0473-3>.
- Fedorova, Maria, Ravi Chand Bollineni, et Ralf Hoffmann. 2014. « Protein Carbonylation as a Major Hallmark of Oxidative Damage: Update of Analytical Strategies ». *Mass Spectrometry Reviews* 33 (2): 79-97. <https://doi.org/10.1002/mas.21381>.
- Fenech, M. 2000. « The in Vitro Micronucleus Technique ». *Mutation Research* 455 (1-2): 81-95. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(00)00065-8).
- Fertil, B., et E. P. Malaise. 1981. « Inherent Cellular Radiosensitivity as a Basic Concept for Human Tumor Radiotherapy ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 7 (5): 621-29. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(81\)90377-1](https://doi.org/10.1016/0360-3016(81)90377-1).
- Fletcher, Sally C., Claudia P. Grou, Arnaud J. Legrand, Xin Chen, Kalle Soderstrom, Mattia Poletto, et Grigory L. Dianov. 2018. « Sp1 Phosphorylation by ATM Downregulates BER and Promotes Cell Elimination in Response to Persistent DNA Damage ». *Nucleic Acids Research* 46 (4): 1834-46. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1291>.
- Flohé, L., et F. Otting. 1984. « Superoxide Dismutase Assays ». *Methods in Enzymology* 105: 93-104. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05013-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05013-8).
- Focea, R., C. Nadejde, D. Creanga, et T. Luchian. 2012. « Low Dose X –Ray Effects on Catalase Activity in Animal Tissue ». *Journal of Physics: Conference Series* 398 (1): 012032. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/398/1/012032>.
- Franken, Nicolaas A. P., Hans M. Rodermond, Jan Stap, Jaap Haveman, et Chris van Bree. 2006. « Clonogenic Assay of Cells in Vitro ». *Nature Protocols* 1 (5): 2315-19. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>.
- Freedberg, Irwin M., Marjana Tomic-Canic, Mayumi Komine, et Miroslav Blumenberg. 2001. « Keratins and the Keratinocyte Activation Cycle ». *Journal of Investigative Dermatology* 116 (5): 633-40. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2001.01327.x>.
- Friguet, Bertrand. 2006. « Oxidized Protein Degradation and Repair in Ageing and Oxidative Stress ». *FEBS Letters* 580 (12): 2910-16. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.03.028>.
- Gao, Feng, Pengyuan Liu, Jayashree Narayanan, Meiyang Yang, Brian L. Fish, Yong Liu, Mingyu Liang, Elizabeth R. Jacobs, et Meetha Medhora. 2017. « Changes in MiRNA in the Lung and Whole Blood after Whole Thorax Irradiation in Rats ». *Scientific Reports* 7 (1): 44132. <https://doi.org/10.1038/srep44132>.
- Gaschler, Michael M., et Brent R. Stockwell. 2017. « Lipid peroxidation in cell death ». *Biochemical and biophysical research communications* 482 (3): 419-25. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>.
- Ghosh, Sanchita P., Rupak Pathak, Parameet Kumar, Shukla Biswas, Sharmistha Bhattacharyya, Vidya P. Kumar, Martin Hauer-Jensen, et Roopa Biswas. 2016. « Gamma-Tocotrienol Modulates Radiation-Induced MicroRNA Expression in Mouse Spleen ». *Radiation Research* 185 (5): 485. <https://doi.org/10.1667/RR14248.1>.

- Giedzinski, Erich, Radoslaw Rola, John R. Fike, et Charles L. Limoli. 2005. « Efficient Production of Reactive Oxygen Species in Neural Precursor Cells after Exposure to 250 MeV Protons ». *Radiation Research* 164 (4 Pt 2): 540-44. <https://doi.org/10.1667/rr3369.1>.
- Ginot, A., J. Doyen, J.-M. Hannoun-Lévi, et A. Courdi. 2010. « Dose de tolérance des tissus sains : la peau et les phanères ». */data/revues/12783218/v14i4-5/S1278321810000843/*, août. <https://www.em-consulte.com/en/article/261256>.
- Girdhani, Swati, Clare Lamont, Philip Hahnfeldt, Amir Abdollahi, et Lynn Hlatky. 2012. « Proton Irradiation Suppresses Angiogenic Genes and Impairs Cell Invasion and Tumor Growth ». *Radiation Research* 178 (1): 33-45.
- Girdhani, Swati, Rainer Sachs, et Lynn Hlatky. 2013. « Biological Effects of Proton Radiation: What We Know and Don't Know ». *Radiation Research* 179 (3): 257-72. <https://doi.org/10.1667/RR2839.1>.
- Giridhar, Prashanth, Supriya Mallick, Goura Kishore Rath, et Pramod Kumar Julka. 2015. « Radiation Induced Lung Injury: Prediction, Assessment and Management ». *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP* 16 (7): 2613-17.
- Glebova, Kristina, Natalya Veiko, Svetlana Kostyuk, Vera Izhevskaya, et Ancha Baranova. 2015. « Oxidized Extracellular DNA as a Stress Signal That May Modify Response to Anticancer Therapy ». *Cancer Letters* 356 (1): 22-33. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.09.005>.
- Godon, Camille, Fabrice P. Cordelières, Denis Biard, Nicole Giocanti, Frédérique Mégnin-Chanet, Janet Hall, et Vincent Favaudon. 2008. « PARP Inhibition versus PARP-1 Silencing: Different Outcomes in Terms of Single-Strand Break Repair and Radiation Susceptibility ». *Nucleic Acids Research* 36 (13): 4454-64. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn403>.
- Gong, Pijun, Tingting Zhang, Dalin He, et Jer-Tsong Hsieh. 2015. « MicroRNA-145 Modulates Tumor Sensitivity to Radiation in Prostate Cancer ». *Radiation Research* 184 (6): 630. <https://doi.org/10.1667/RR14185.1>.
- Goodarzi, Aaron A., et Penny A. Jeggo. 2012. « Irradiation Induced Foci (IRIF) as a Biomarker for Radiosensitivity ». *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, DNA Repair as a biomarker, 736 (1): 39-47. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.05.017>.
- Goodhead, Dudley T. 2010. « New Radiobiological, Radiation Risk and Radiation Protection Paradigms ». *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 687 (1-2): 13-16. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2010.01.006>.
- Goudable, Joëlle, et Alain Favier. 1997. « Radicaux libres oxygénés et antioxydants ». *Nutrition Clinique et Métabolisme* 11 (2): 115-20. [https://doi.org/10.1016/S0985-0562\(97\)80058-1](https://doi.org/10.1016/S0985-0562(97)80058-1).
- Goutham, Hassan Venkatesh, Kamalesh Dattaram Mumbrekar, Bejadi Manjunath Vadhiraja, Donald Jerard Fernandes, Krishna Sharan, Guruprasad Kanive Parashiva, Satyamoorthy Kapaettu, et Satish Rao Bola Sadashiva. 2012. « DNA Double-Strand Break Analysis by γ -H2AX Foci: A Useful Method for Determining the Overreactors to Radiation-Induced Acute Reactions among Head-and-Neck Cancer Patients ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 84 (5): e607-612. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2012.06.041>.
- Grant, Stephen R., David R. Grosshans, Stephen D. Bilton, John A. Garcia, Mayank Amin, Mark S. Chambers, Susan L. McGovern, et al. 2015. « Proton versus Conventional Radiotherapy for Pediatric Salivary Gland Tumors: Acute Toxicity and Dosimetric Characteristics ». *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 116 (2): 309-15. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2015.07.022>.

- Granzotto, Adeline, Aurélie Joubert, Muriel Viau, Clément Devic, Mira Maalouf, Charles Thomas, Guillaume Vogin, et al. 2011. « Réponse individuelle aux radiations ionisantes : quel(s) test(s) prédictif(s) choisir ? » *Comptes Rendus Biologies* 334 (2): 140-57. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.12.018>.
- Green, Thomas E. Merchant, Catherine A. Billups, Dennis C. Stokes, Alberto Broniscer, Ute Bartels, Murali Chintagumpala, et al. 2015. « Pulmonary Function after Treatment for Embryonal Brain Tumors on SJMB03 that Included Craniospinal Irradiation ». *International journal of radiation oncology, biology, physics* 93 (1): 47-53. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2015.05.019>.
- Green, D. K. Murray, A. M. Bant, G. Kazarians, M. F. Moyers, G. A. Nelson, et D. T. Tran. 2001. « Response of Thyroid Follicular Cells to Gamma Irradiation Compared to Proton Irradiation. I. Initial Characterization of DNA Damage, Micronucleus Formation, Apoptosis, Cell Survival, and Cell Cycle Phase Redistribution ». *Radiation Research* 155 (1 Pt 1): 32-42. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2001\)155\[0032:rotfct\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2001)155[0032:rotfct]2.0.co;2).
- Gridley, T. L. Freeman, A. Y. Makinde, A. J. Wroe, X. Luo-Owen, J. Tian, X. W. Mao, et al. 2011. « Comparison of Proton and Electron Radiation Effects on Biological Responses in Liver, Spleen and Blood ». *Int J Radiat Biol* 87 (12): 1173-81. <https://doi.org/10.3109/09553002.2011.624393>.
- Gridley, Michael J. Pecaut, Xiao W. Mao, Andrew J. Wroe, et Xian Luo-Owen. 2015. « Biological Effects of Passive versus Active Scanning Proton Beams on Human Lung Epithelial Cells ». *Technology in Cancer Research & Treatment* 14 (1): 81-98. <https://doi.org/10.7785/tcrt.2012.500392>.
- Grune, Tilman, Tobias Jung, Katrin Merker, et Kelvin J. A. Davies. 2004. « Decreased Proteolysis Caused by Protein Aggregates, Inclusion Bodies, Plaques, Lipofuscin, Ceroid, and “aggresomes” during Oxidative Stress, Aging, and Disease ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36 (12): 2519-30. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.04.020>.
- Grutters, Janneke P. C., Alfons G. H. Kessels, Madelon Pijls-Johannesma, Dirk De Ruyscher, Manuela A. Joore, et Philippe Lambin. 2010. « Comparison of the Effectiveness of Radiotherapy with Photons, Protons and Carbon-Ions for Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis ». *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 95 (1): 32-40. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2009.08.003>.
- Guan, J., J. Stewart, J. H. Ware, Z. Zhou, J. J. Donahue, et A. R. Kennedy. 2006. « Effects of Dietary Supplements on the Space Radiation-Induced Reduction in Total Antioxidant Status in CBA Mice ». *Radiat Res* 165 (4): 373-78.
- Gueulette, J., L. Bohm, J. P. Slabbert, B. M. De Coster, G. S. Rutherford, A. Ruifrok, M. Octave-Prignot, et al. 2000. « Proton Relative Biological Effectiveness (RBE) for Survival in Mice after Thoracic Irradiation with Fractionated Doses ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 47 (4): 1051-58. [https://doi.org/10.1016/s0360-3016\(00\)00535-6](https://doi.org/10.1016/s0360-3016(00)00535-6).
- Gunther, Jillian R., Mariko Sato, Murali Chintagumpala, Leena Ketonen, Jeremy Y. Jones, Pamela K. Allen, Arnold C. Paulino, et al. 2015. « Imaging Changes in Pediatric Intracranial Ependymoma Patients Treated With Proton Beam Radiation Therapy Compared to Intensity Modulated Radiation Therapy ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 93 (1): 54-63. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2015.05.018>.
- Hada, Megumi, Honglu Wu, et Francis A. Cucinotta. 2011. « MBAND Analysis for High- and Low-LET Radiation-Induced Chromosome Aberrations: A Review ». *Mutation Research* 711 (1-2): 187-92. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2010.12.018>.
- Hagdoost, Yukio Maruyama, Roberto Pecoits-Filho, Olof Heimburger, Astrid Seeberger, Björn

- Anderstam, Mohamed E. Suliman, et al. 2006. « Elevated Serum 8-Oxo-DG in Hemodialysis Patients: A Marker of Systemic Inflammation? » *Antioxidants & Redox Signaling* 8 (11-12): 2169-73. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.2169>.
- Haghdoost, Lena Sjölander, Stefan Czene, et Mats Harms-Ringdahl. 2006. « The Nucleotide Pool Is a Significant Target for Oxidative Stress ». *Free Radical Biology & Medicine* 41 (4): 620-26. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.05.003>.
- Haghdoost, P. Svoboda, I. Näslund, M. Harms-Ringdahl, A. Tilikides, et S. Skog. 2001. « Can 8-Oxo-DG Be Used as a Predictor for Individual Radiosensitivity? » *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 50: 405-10. [https://doi.org/10.1016/s0360-3016\(00\)01580-7](https://doi.org/10.1016/s0360-3016(00)01580-7).
- Halimi, Mohammad, S. Mohsen Asghari, Reyhaneh Sariri, Dariush Moslemi, et Hadi Parsian. 2012. « Cellular Response to Ionizing Radiation: A MicroRNA Story ». *International Journal of Molecular and Cellular Medicine* 1 (4): 178-84.
- Hall, Eric J. 2006. « Intensity-Modulated Radiation Therapy, Protons, and the Risk of Second Cancers ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 65 (1): 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2006.01.027>.
- Hanania, Alexander N., Walker Mainwaring, Yohannes T. Ghebre, Nicola A. Hanania, et Michelle Ludwig. 2019. « Radiation-Induced Lung Injury: Assessment and Management ». *Chest* 156 (1): 150-62. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2019.03.033>.
- Hennequin, C., L. Quero, et V. Favaudon. 2008. « Déterminants et facteurs prédictifs pour la radiosensibilité tumorale ». *Cancer/Radiothérapie* 12: 3-13. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2007.11.007>.
- Hennequin, Christophe, Laurent Quero, et Vincent Favaudon. 2011. « [DNA repair and tumour radiosensitivity: focus on ATM gene] ». *Bulletin Du Cancer* 98 (3): 239-46. <https://doi.org/10.1684/bdc.2011.1324>.
- Hoeijmakers, J. H. 2001. « Genome Maintenance Mechanisms for Preventing Cancer ». *Nature* 411 (6835): 366-74. <https://doi.org/10.1038/35077232>.
- Hong, Zehui, Jie Jiang, Kazunari Hashiguchi, Mikiko Hoshi, Li Lan, et Akira Yasui. 2008. « Recruitment of Mismatch Repair Proteins to the Site of DNA Damage in Human Cells ». *Journal of Cell Science* 121 (Pt 19): 3146-54. <https://doi.org/10.1242/jcs.026393>.
- Huang, Yijuan, Weiqiang Zhang, Fangrong Yu, et Fu Gao. 2017. « The Cellular and Molecular Mechanism of Radiation-Induced Lung Injury ». *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 23 (juillet): 3446-50. <https://doi.org/10.12659/msm.902353>.
- IAEA. 2019. « Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies ». IAEA. février 2019.
- Iizawa, O., T. Kato, H. Tagami, H. Akamatsu, et Y. Niwa. 1994. « Long-Term Follow-up Study of Changes in Lipid Peroxide Levels and the Activity of Superoxide Dismutase, Catalase and Glutathione Peroxidase in Mouse Skin after Acute and Chronic UV Irradiation ». *Archives of Dermatological Research* 286 (1): 47-52. <https://doi.org/10.1007/BF00375843>.
- Ikwegbue, Paul Chukwudi, Priscilla Masamba, Babatunji Emmanuel Oyinloye, et Abidemi Paul Kappo. 2017. « Roles of Heat Shock Proteins in Apoptosis, Oxidative Stress, Human Inflammatory Diseases, and Cancer ». *Pharmaceuticals* 11 (1). <https://doi.org/10.3390/ph11010002>.

Ilicic, K., S. E. Combs, et T. E. Schmid. 2018. « New insights in the relative radiobiological effectiveness of proton irradiation ». *Radiation Oncology (London, England)* 13 (janvier). <https://doi.org/10.1186/s13014-018-0954-9>.

Ischiropoulos. 1992. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. <https://www.journals.elsevier.com/archives-of-biochemistry-and-biophysics>.

Jackson, Stephen P., et Jiri Bartek. 2009. « The DNA-Damage Response in Human Biology and Disease ». *Nature* 461 (7267): 1071-78. <https://doi.org/10.1038/nature08467>.

Jacob, Sophie, Atul Pathak, Denis Franck, Igor Latorzeff, Gaelle Jimenez, Olivier Fondard, Matthieu Lapeyre, et al. 2016. « Early Detection and Prediction of Cardiotoxicity after Radiation Therapy for Breast Cancer: The BACCARAT Prospective Cohort Study ». *Radiation Oncology (London, England)* 11 (avril): 54. <https://doi.org/10.1186/s13014-016-0627-5>.

Janku, Filip, David J. McConkey, David S. Hong, et Razelle Kurzrock. 2011. « Autophagy as a Target for Anticancer Therapy ». *Nature Reviews. Clinical Oncology* 8 (9): 528-39. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.71>.

Jardim, Bruna Victorasso, Marina Gobbe Moschetta, Camila Leonel, Gabriela Bottaro Gelaleti, Vitor Rafael Regiani, Lívia Carvalho Ferreira, Juliana Ramos Lopes, et Debora Ap Pires de Campos Zuccari. 2013. « Glutathione and Glutathione Peroxidase Expression in Breast Cancer: An Immunohistochemical and Molecular Study ». *Oncology Reports* 30 (3): 1119-28. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2540>.

Jenner, T. J., M. Belli, D. T. Goodhead, F. Ianzini, G. Simone, et M. A. Tabocchini. 1992. « Direct Comparison of Biological Effectiveness of Protons and Alpha-particles of the Same LET. III. Initial Yield of DNA Double-strand Breaks in V79 Cells ». *International Journal of Radiation Biology* 61 (5): 631-37. <https://doi.org/10.1080/09553009214551441>.

Jesseph, W. H. Moore, R. F. Straub, G. M. Tisljar-Lentulis, et V. P. Bond. 1968. « The RBE of 2.2-BeV Protons for 30-Day Lethality in Mice ». *Radiation Research* 36 (2): 242-53.

Jiang, X. Chen, W. Tian, X. Yin, J. Wang, et H. Yang. 2014. « The Role of TGF- β 1-MiR-21-ROS Pathway in Bystander Responses Induced by Irradiated Non-Small-Cell Lung Cancer Cells ». *British Journal of Cancer* 111 (4): 772-80. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.368>.

Jiang, Man, Zhongbin Sun, Erle Dang, Bing Li, Hui Fang, Junqin Li, Lin Gao, Kaiming Zhang, et Gang Wang. 2017. « TGF β /SMAD/MicroRNA-486-3p Signaling Axis Mediates Keratin 17 Expression and Keratinocyte Hyperproliferation in Psoriasis ». *Journal of Investigative Dermatology* 137 (10): 2177-86. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.06.005>.

Johansson, Bengt, Mona Ridderheim, et Bengt Glimelius. 2005. « The Potential of Proton Beam Radiation Therapy in Prostate Cancer, Other Urological Cancers and Gynaecological Cancers ». *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)* 44 (8): 890-95. <https://doi.org/10.1080/02841860500355942>.

Joksic, G., S. B. Pajovic, M. Stankovic, S. Pejic, J. Kasapovic, G. Cuttone, N. Calonghi, L. Masotti, et D. T. Kanazir. 2000. « Chromosome Aberrations, Micronuclei, and Activity of Superoxide Dismutases in Human Lymphocytes after Irradiation in Vitro ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 57 (5): 842-50. <https://doi.org/10.1007/s000180050046>.

Kahalley, Lisa S., M. Douglas Ris, David R. Grosshans, M. Fatih Okcu, Arnold C. Paulino, Murali Chintagumpala, Bartlett D. Moore, et al. 2016. « Comparing Intelligence Quotient Change After Treatment With Proton Versus Photon Radiation Therapy for Pediatric Brain Tumors ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 34 (10): 1043-49. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.62.1383>.

- Kajioka, Andres MI, Li J, Mao Xw, Moyers Mf, Nelson Ga, Slater Jm, et Gridley Ds. 2000. « Acute Effects of Whole-Body Proton Irradiation on the Immune System of the Mouse ». *Radiation Research*. Radiat Res. mai 2000. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2000\)153\[0587:aeowbp\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2000)153[0587:aeowbp]2.0.co;2).
- Kelley, Mark R, Derek Logsdon, et Melissa L Fishel. 2014. « Targeting DNA repair pathways for cancer treatment: what's new? » *Future oncology (London, England)* 10 (7): 1215-37. <https://doi.org/10.2217/fon.14.60>.
- Khan, Shahid Yar, Muhammad Akram Tariq, James Patrick Perrott, Christopher Drew Brumbaugh, Hyunsung John Kim, Muhammad Imran Shabbir, Govindarajan T. Ramesh, et Nader Pourmand. 2013. « Distinctive MicroRNA Expression Signatures in Proton-Irradiated Mice ». *Molecular and Cellular Biochemistry* 382 (1-2): 225-35. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1738-z>.
- Kim, Yong-Chul, Michal Barshishat-Kupper, Elizabeth A. McCart, Gregory P. Mueller, et Regina M. Day. 2014. « Bone Marrow Protein Oxidation in Response to Ionizing Radiation in C57BL/6J Mice ». *Proteomes* 2 (3): 291-302. <https://doi.org/10.3390/proteomes2030291>.
- Kinnula, Vuokko L., et James D. Crapo. 2003. « Superoxide Dismutases in the Lung and Human Lung Diseases ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 167 (12): 1600-1619. <https://doi.org/10.1164/rccm.200212-1479SO>.
- Ko, Hui Ling, et Ee Chee Ren. 2012. « Functional Aspects of PARP1 in DNA Repair and Transcription ». *Biomolecules* 2 (4): 524-48. <https://doi.org/10.3390/biom2040524>.
- Kojo, Shosuke. 2004. « Vitamin C: Basic Metabolism and Its Function as an Index of Oxidative Stress ». *Current Medicinal Chemistry* 11 (8): 1041-64. <https://doi.org/10.2174/0929867043455567>.
- Kundel, H. L. 1966. « The Effect of Gamma Irradiation on the Cardiovascular System of the Rhesus Monkey ». *Radiation Research* 27 (3): 406-18.
- Lacombe, J., O. Riou, J. Solassol, A. Mangé, C. Bourgier, P. Fenoglietto, A. Pèlerin, M. Ozsahin, et D. Azria. 2013. « Radiosensibilité individuelle: les tests vont changer nos pratiques ». *Cancer/Radiothérapie* 17 (5-6): 337-43. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2013.07.137>.
- Lagadu, Stéphanie, Ivannah Pottier, François Sichel, Carine Laurent, Jean-Louis Lefaix, et Virginie Prevost. 2010. « Detection of Extracellular 8-Oxo-7,8-Dihydro-2'-Deoxyguanosine as a Biomarker of Oxidative Damage in X-Irradiated Fibroblast Cultures: Optimization of Analytical Procedure ». *Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals* 15 (8): 707-14. <https://doi.org/10.3109/1354750X.2010.511269>.
- Lamadrid, Ana I., Omar García, Martine Delbos, Philippe Voisin, et Laurence Roy. 2007. « PCC-ring Induction in Human Lymphocytes Exposed to Gamma and Neutron Irradiation ». *Journal of Radiation Research* 48 (1): 1-6. <https://doi.org/10.1269/jrr.0625>.
- Land, E., R. Bensasson, et T. G. Truscott. 1993. « Excited States and Free Radicals in Biology and Medicine: Contributions from Flash Photolysis and Pulse Radiolysis ». Undefined. 1993. /paper/Excited-States-and-Free-Radicals-in-Biology-and-and-Land-Bensasson/9ba2812a9ff644e4741930ad9fd00bb1e9cdb653.
- Lartigau, E., S. Dewas, et L. Gras. 2008. « L'effet Oxygène, une cible ancienne toujours d'actualité ? » *Cancer/Radiothérapie, Radiobiologie et Thérapeutiques ciblées*, 12 (1): 42-49. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2007.12.003>.
- Laurent. 2018. « Oxidative Stress in Hadrontherapy ». *Novel Prospects in Oxidative and Nitrosative Stress*, mai. <https://doi.org/10.5772/intechopen.73238>.

- Laurent, C., A. Leduc, I. Pottier, V. Prévost, F. Sichel, et J. L. Lefaix. 2013. « Dramatic Increase in Oxidative Stress in Carbon-Irradiated Normal Human Skin Fibroblasts ». *PLoS One* 8 (12): e85158. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085158>.
- Laurent, Jean-Pierre Pouget, et Philippe Voisin. 2005. « Modulation of DNA Damage by Pentoxifylline and Alpha-Tocopherol in Skin Fibroblasts Exposed to Gamma Rays ». *Radiation Research* 164 (1): 63-72.
- Laurent, Philippe Voisin, et Jean-Pierre Pouget. 2006. « DNA Damage in Cultured Skin Microvascular Endothelial Cells Exposed to Gamma Rays and Treated by the Combination Pentoxifylline and Alpha-Tocopherol ». *International Journal of Radiation Biology* 82 (5): 309-21. <https://doi.org/10.1080/09553000600733150>.
- Le, M., C. E. Mothersill, C. B. Seymour, A. J. Rainbow, et F. E. McNeill. 2017. « An Observed Effect of P53 Status on the Bystander Response to Radiation-Induced Cellular Photon Emission ». *Radiation Research* 187 (2): 169-85. <https://doi.org/10.1667/RR14342.1>.
- Leloup, C., G. Garty, G. Assaf, A. Cristovão, A. Breskin, R. Chechik, S. Shchemelinin, et al. 2005. « Evaluation of Lesion Clustering in Irradiated Plasmid DNA ». *International Journal of Radiation Biology* 81 (1): 41-54. <https://doi.org/10.1080/09553000400017895>.
- Levine, Beth, et Guido Kroemer. 2008. « Autophagy in the Pathogenesis of Disease ». *Cell* 132 (1): 27-42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.018>.
- Liao, A. C., B. M. Craver, B. P. Tseng, K. K. Tran, V. K. Parihar, M. M. Acharya, et C. L. Limoli. 2013. « Mitochondrial-Targeted Human Catalase Affords Neuroprotection from Proton Irradiation ». *Radiat Res* 180 (1): 1-6. <https://doi.org/10.1667/RR3339.1>.
- Lindholm, Stricklin D, Jaworska A, Koivistoinen A, Paile W, Arvidsson E, Deperas-Standylo J, et Wojcik A. 2010. « Premature Chromosome Condensation (PCC) Assay for Dose Assessment in Mass Casualty Accidents ». *Radiation Research. Radiat Res.* janvier 2010. <https://doi.org/10.1667/RR1843.1>.
- Loeffler, Jay S., et Marco Durante. 2013. « Charged Particle Therapy--Optimization, Challenges and Future Directions ». *Nature Reviews. Clinical Oncology* 10 (7): 411-24. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.79>.
- Lomax, A. J. 2008. « Intensity Modulated Proton Therapy and Its Sensitivity to Treatment Uncertainties 2: The Potential Effects of Inter-Fraction and Inter-Field Motions ». *Physics in Medicine and Biology* 53 (4): 1043-56. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/53/4/015>.
- Lu, Shelly C. 2013. « Glutathione Synthesis ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1830 (5): 3143-53. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.008>.
- Lundkvist, Jonas, Mattias Ekman, Suzanne Rehn Ericsson, Bengt Jönsson, et Bengt Glimelius. 2005. « Cost-Effectiveness of Proton Radiation in the Treatment of Childhood Medulloblastoma ». *Cancer* 103 (4): 793-801. <https://doi.org/10.1002/cncr.20844>.
- Lv, Huanhuan, Chenxiao Zhen, Junyu Liu, Pengfei Yang, Lijiang Hu, et Peng Shang. 2019. « Unraveling the Potential Role of Glutathione in Multiple Forms of Cell Death in Cancer Therapy ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019 (juin). <https://doi.org/10.1155/2019/3150145>.
- MacDonald, Shannon M., Rachel Jimenez, Peter Paetzold, Judith Adams, Jonathan Beatty, Thomas F. DeLaney, Hanne Kooy, Alphonse G. Taghian, et Hsiao-Ming Lu. 2013. « Proton Radiotherapy for Chest Wall and Regional Lymphatic Radiation; Dose Comparisons and Treatment Delivery ». *Radiation Oncology (London, England)* 8 (mars): 71. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-8-71>.

- Mailleux, Arnaud A., Matej Krajcovic, et Michael Overholtzer. 2011. « Le cannibalisme cellulaire par entose - Un nouveau mécanisme d'aneuploïdie tumorale ». *médecine/sciences* 27 (8-9): 689-91. <https://doi.org/10.1051/medsci/2011278003>.
- Mangoni, Monica, Mariangela Sottili, Chiara Gerini, Pierluigi Bonomo, Anna Bottoncetti, Francesca Castiglione, Ciro Franzese, et al. 2015. « A PPAR-Gamma Agonist Attenuates Pulmonary Injury Induced by Irradiation in a Murine Model ». *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 90 (3): 405-9. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2015.11.005>.
- Mao, L. M. Green, T. Mekonnen, N. Lindsey, et D. S. Gridley. 2010. « Gene Expression Analysis of Oxidative Stress and Apoptosis in Proton-Irradiated Rat Retina ». *In Vivo* 24 (4): 425-30.
- Marrocco, I., F. Altieri, et I. Peluso. 2017. « Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017: 6501046. <https://doi.org/10.1155/2017/6501046>.
- Martins, Isabelle, Syed Qasim Raza, Laurent Voisin, Haithem Dakhli, Frédéric Law, Dorine De Jong, Awatef Allouch, et al. 2017. « Entosis: The emerging face of non-cell-autonomous type IV programmed death ». *Biomedical Journal* 40 (3): 133-40. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2017.05.001>.
- Matsubara, Hiroaki, Kumiko Karasawa, Wataru Furuichi, Mitsuji Wakaisami, Shintaro Shiba, Masaru Wakatsuki, Tokuhiko Omatsu, Taku Inaniwa, Shigekazu Fukuda, et Tadashi Kamada. 2018. « Comparison of passive and scanning irradiation methods for carbon-ion radiotherapy for breast cancer ». *Journal of Radiation Research* 59 (5): 625-31. <https://doi.org/10.1093/jrr/rry052>.
- McMahon, Stephen J., Aimee L. McNamara, Jan Schuemann, Harald Paganetti, et Kevin M. Prise. 2017. « A General Mechanistic Model Enables Predictions of the Biological Effectiveness of Different Qualities of Radiation ». *Scientific Reports* 7 (1): 10790. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10820-1>.
- Me, Perry. 2004. « Mdm2 in the Response to Radiation ». *Molecular Cancer Research : MCR. Mol Cancer Res.* janvier 2004. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14757841/>.
- Menolfi, Demis, et Shan Zha. 2020. « ATM, DNA-PKcs and ATR: Shaping Development through the Regulation of the DNA Damage Responses ». *Genome Instability & Disease* 1 (2): 47-68. <https://doi.org/10.1007/s42764-019-00003-9>.
- Mering, C. v. 2003. « STRING: a database of predicted functional associations between proteins ». *Nucleic Acids Research* 31 (1): 258-61. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg034>.
- Metheetraitut, Chanatip, et Frank J Slack. 2013. « MicroRNAs in the Ionizing Radiation Response and in Radiotherapy ». *Current Opinion in Genetics & Development* 23 (1): 12-19. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2013.01.002>.
- Michaelidesová, Anna, Jana Konířová, Jana Vachelová, Vladimír Vondráček, et Marie Davidková. 2016. « Nowadays Proton Therapy: Double Scattering versus Pencil Beam Scanning Mode ». *Physica Medica, Abstracts from the 1st European Congress of Medical Physics*, 32 (septembre): 309-10. <https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2016.07.174>.
- Migdal, Camille, et Mireille Serres. 2011. « [Reactive oxygen species and oxidative stress] ». *Medicine Sciences: M/S* 27 (4): 405-12. <https://doi.org/10.1051/medsci/2011274017>.
- Milisav, Irina, Samo Ribarič, et Borut Poljsak. 2018. « Antioxidant Vitamins and Ageing ». *Sub-Cellular Biochemistry* 90: 1-23. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2835-0_1.
- Mirjolet, Céline, Romain Boidot, Sébastien Saliques, François Ghiringhelli, Philippe Maingon, et Gilles Créhange. 2015. « The Role of Telomeres in Predicting Individual Radiosensitivity of Patients with

- Cancer in the Era of Personalized Radiotherapy ». *Cancer Treatment Reviews* 41 (4): 354-60. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2015.02.005>.
- Mirończuk-Chodakowska, Iwona, Anna Maria Witkowska, et Małgorzata Elżbieta Zujko. 2018. « Endogenous Non-Enzymatic Antioxidants in the Human Body ». *Advances in Medical Sciences* 63 (1): 68-78. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.05.005>.
- Mishra. 2004. « Cell Membrane Oxidative Damage Induced by Gamma-Radiation and Apoptotic Sensitivity ». *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology: Official Organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer* 23 (1): 61-66. <https://doi.org/10.1615/jenvpathtoxoncol.v23.i1.60>.
- Mishra, Rahul Khairnar, Søren M. Bentzen, Gary Larson, Henry Tsai, Christopher Sinesi, Carlos Vargas, et al. 2019. « Proton beam therapy delivered using pencil beam scanning vs. passive scattering/uniform scanning for localized prostate cancer: Comparative toxicity analysis of PCG 001-09 ». *Clinical and Translational Radiation Oncology* 19 (août): 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.ctro.2019.08.006>.
- Miyawaki, Daisuke, Masao Murakami, Yusuke Demizu, Ryohei Sasaki, Yasue Niwa, Kazuki Terashima, Hideki Nishimura, Yoshio Hishikawa, et Kazuro Sugimura. 2009. « Brain Injury after Proton Therapy or Carbon Ion Therapy for Head-and-Neck Cancer and Skull Base Tumors ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 75 (2): 378-84. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2008.12.092>.
- Miyazawa, Gregor C. Burdeos, Mayuko Itaya, Kiyotaka Nakagawa, et Teruo Miyazawa. 2019. « Vitamin E: Regulatory Redox Interactions ». *IUBMB Life* 71 (4): 430-41. <https://doi.org/10.1002/iub.2008>.
- M'kacher, Bennaceur-Griscelli A, Girinsky T, Koscielny S, Delhommeau F, Dossou J, Violot D, et al. 2007. « Telomere Shortening and Associated Chromosomal Instability in Peripheral Blood Lymphocytes of Patients with Hodgkin's Lymphoma Prior to Any Treatment Are Predictive of Second Cancers ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics. Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 6 janvier 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2007.01.050>.
- Moertel, H., J. C. Georgi, L. Distel, W. Eyrich, M. Fritsch, G. Grabenbauer, et R. Sauer. 2004. « Effects of Low Energy Protons on Clonogenic Survival, DSB Repair and Cell Cycle in Human Glioblastoma Cells and B14 Fibroblasts ». *Radiother Oncol* 73 Suppl 2 (décembre): S115-8.
- Mohan, Radhe, et David Grosshans. 2017. « Proton Therapy - Present and Future ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 109 (janvier): 26-44. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.11.006>.
- Mohiuddin, Ismail S., et Min H. Kang. 2019. « DNA-PK as an Emerging Therapeutic Target in Cancer ». *Frontiers in Oncology* 9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00635>.
- Montour, J. L., R. F. Straub, et C. J. Shellabarger. 1969. « The Relative Biological Effectiveness of 2.2 GeV Protons for Thymic and Splenic Weight-loss in Mice ». *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine* 15 (5): 491-96. <https://doi.org/10.1080/09553006914550781>.
- Moreels, Marjan, Bjorn Baselet, Olivier Van Hoey, Filip Vanhavere, et Sarah Baatout. 2020. « Stress and Radiation Responsiveness ». In *Stress Challenges and Immunity in Space: From Mechanisms to Monitoring and Preventive Strategies*, édité par Alexander Choukèr, 373-404. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16996-1_20.
- Murayama, S. 1990. « [Late radiation fibrosis in rat lung following protons and 250 kV X-rays irradiation] ». *Nihon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi. Nippon Acta Radiologica* 50 (4): 412-22.

- Mustonen, R., G. Bouvier, G. Wolber, M. Stöhr, P. Peschke, et H. Bartsch. 1999. « A Comparison of Gamma and Neutron Irradiation on Raji Cells: Effects on DNA Damage, Repair, Cell Cycle Distribution and Lethality ». *Mutation Research* 429 (2): 169-79. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(99\)00123-2](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(99)00123-2).
- Nachtrab, U., U. Oppitz, M. Flentje, et H. Stopper. 1998. « Radiation-Induced Micronucleus Formation in Human Skin Fibroblasts of Patients Showing Severe and Normal Tissue Damage after Radiotherapy ». *International Journal of Radiation Biology* 73 (3): 279-87.
- Nagasawa, H., P. Keng, R. Harley, W. Dahlberg, et J. B. Little. 1994. « Relationship between Gamma-Ray-Induced G2/M Delay and Cellular Radiosensitivity ». *International Journal of Radiation Biology* 66 (4): 373-79. <https://doi.org/10.1080/09553009414551311>.
- Naka, Kazuhito, Akira Tachibana, Kyoji Ikeda, et Noboru Motoyama. 2004. « Stress-Induced Premature Senescence in HTERT-Expressing Ataxia Telangiectasia Fibroblasts ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (3): 2030-37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309457200>.
- Nanashima, Naoki, Koichi Ito, Takashi Ishikawa, Manabu Nakano, et Toshiya Nakamura. 2012. « Damage of Hair Follicle Stem Cells and Alteration of Keratin Expression in External Radiation-Induced Acute Alopecia ». *International Journal of Molecular Medicine* 30 (3): 579-84. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.1018>.
- Nemoto, K, T Pickles, Al Minchinton, et GK Lam. 1998. « The relative biological effectiveness of the modulated proton beam at TRIUMF. - Abstract - Europe PMC ». janvier 1998.
- Nguyen, Baptiste, Georges Farkouh, Séverine Raquin, et Karim Benihoud. 2016. « Réponse cellulaire à l'adénovirus 5: Une réponse aux dommages à l'ADN revisitée ». *médecine/sciences* 32 (10): 830-32. <https://doi.org/10.1051/medsci/20163210013>.
- Nielsen, Steffen, Niels Bassler, Leszek Grzanka, Louise Laursen, Jan Swakon, Pawel Olko, Christian Nicolaj Andreassen, Jan Alsner, et Brita Singers Sørensen. 2019. « Comparison of Coding Transcriptomes in Fibroblasts Irradiated With Low and High LET Proton Beams and Cobalt-60 Photons ». *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*Physics* 103 (5): 1203-11. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2018.11.065>.
- Núñez, M. I., M. R. Guerrero, E. López, M. R. del Moral, M. T. Valenzuela, E. Siles, M. Villalobos, V. Pedraza, J. H. Peacock, et J. M. Ruiz de Almodóvar. 1998. « DNA Damage and Prediction of Radiation Response in Lymphocytes and Epidermal Skin Human Cells ». *International Journal of Cancer* 76 (3): 354-61.
- Nuryadi, Endang, Tiara Bunga Mayang Permata, Shuichiro Komatsu, Takahiro Oike, et Takashi Nakano. 2018. « Inter-Assay Precision of Clonogenic Assays for Radiosensitivity in Cancer Cell Line A549 ». *Oncotarget* 9 (17): 13706-12. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24448>.
- Nuszkiewicz, Jarosław, Alina Woźniak, et Karolina Szewczyk-Golec. 2020. « Ionizing Radiation as a Source of Oxidative Stress—The Protective Role of Melatonin and Vitamin D ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (16). <https://doi.org/10.3390/ijms21165804>.
- Oh, Jung Hun, Jeffrey M. Craft, Reid Townsend, Joseph O. Deasy, Jeffrey D. Bradley, et Issam El Naqa. 2011. « A Bioinformatics Approach for Biomarker Identification in Radiation-Induced Lung Inflammation from Limited Proteomics Data ». *Journal of Proteome Research* 10 (3): 1406-15. <https://doi.org/10.1021/pr101226q>.
- Okunieff, Paul, Jianhua Xu, Dongping Hu, Weimin Liu, Lurong Zhang, Gary Morrow, Alice Pentland, Julie L. Ryan, et Ivan Ding. 2006. « Curcumin Protects against Radiation-Induced Acute and Chronic Cutaneous Toxicity in Mice and Decreases mRNA Expression of Inflammatory and Fibrogenic Cytokines ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 65 (3): 890-98.

<https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2006.03.025>.

Oppitz, U., S. Denzinger, U. Nachtrab, M. Flentje, et H. Stopper. 1999. « Radiation-Induced Comet-Formation in Human Skin Fibroblasts from Radiotherapy Patients with Different Normal Tissue Reactions ». *Strahlentherapie Und Onkologie: Organ Der Deutschen Rontgengesellschaft ... [et Al]* 175 (7): 341-46.

Ortholan, C., et F. Mornex. 2010. « Dose de tolérance à l'irradiation des tissus sains : le poumon ». </data/revues/12783218/v14i4-5/S1278321810000442/>, août. <https://www.em-consulte.com/en/article/261243>.

Overholtzer, Michael, Arnaud A. Mailleux, Ghassan Mouneimne, Guillaume Normand, Stuart J. Schnitt, Randall W. King, Edmund S. Cibas, et Joan S. Brugge. 2007. « A Nonapoptotic Cell Death Process, Entosis, That Occurs by Cell-in-Cell Invasion ». *Cell* 131 (5): 966-79. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.040>.

Ozsahin, M. 2005. « CD4 and CD8 T-Lymphocyte Apoptosis Can Predict Radiation-Induced Late Toxicity: A Prospective Study in 399 Patients ». *Clinical Cancer Research* 11 (20): 7426-33. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2634>.

Paganetti. 2002. « Nuclear Interactions in Proton Therapy: Dose and Relative Biological Effect Distributions Originating from Primary and Secondary Particles ». *Physics in Medicine and Biology* 47 (5): 747-64.

———. 2014. « Relative Biological Effectiveness (RBE) Values for Proton Beam Therapy. Variations as a Function of Biological Endpoint, Dose, and Linear Energy Transfer ». *Physics in Medicine and Biology* 59 (22): R419-472. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/59/22/R419>.

Pan, Jianru, Ying Su, Xiaojun Hou, Huocong He, Shutao Liu, Junxin Wu, et Pingfan Rao. 2012. « Protective Effect of Recombinant Protein SOD-TAT on Radiation-Induced Lung Injury in Mice ». *Life Sciences* 91 (3-4): 89-93. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.06.003>.

Park, Eun-Mi, Nithya Ramnath, Gary Y. Yang, Ji-Yeon Ahn, Yoorim Park, Tae-Young Lee, Ho-Sang Shin, Jihnhee Yu, Clement Ip, et Young-Mee Park. 2007. « High SOD and low GPX activities in RBC predict susceptibility of lung cancer patients to radiation pneumonitis ». *Free radical biology & medicine* 42 (2): 280.

Patro, Rob, Geet Duggal, Michael I Love, Rafael A Irizarry, et Carl Kingsford. 2017. « Salmon Provides Fast and Bias-Aware Quantification of Transcript Expression ». *Nature Methods* 14 (4): 417-19. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4197>.

Patyal, Baldev. 2007. « Dosimetry Aspects of Proton Therapy ». *Technology in Cancer Research & Treatment* 6 (4 Suppl): 17-23. <https://doi.org/10.1177/15330346070060S403>.

Paulino, Arnold C., Mark Lobo, Bin S. Teh, M. Fatih Okcu, Michael South, E. Brian Butler, Jack Su, et Murali Chintagumpala. 2010. « Ototoxicity after Intensity-Modulated Radiation Therapy and Cisplatin-Based Chemotherapy in Children with Medulloblastoma ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 78 (5): 1445-50. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2009.09.031>.

Pernot, Eileen, Janet Hall, Sarah Baatout, Mohammed Abderrafi Benotmane, Eric Blanchardon, Simon Bouffler, Houssein El Saghire, et al. 2012. « Ionizing Radiation Biomarkers for Potential Use in Epidemiological Studies ». *Mutation Research* 751 (2): 258-86. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2012.05.003>.

Pion, Emmanuelle, G. Matthias Ullmann, Jean-Christophe Amé, Dominique Gérard, Gilbert de Murcia, et Elisa Bombarda. 2005. « DNA-Induced Dimerization of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 Triggers Its

Activation ». *Biochemistry* 44 (44): 14670-81. <https://doi.org/10.1021/bi050755o>.

Poletto, Mattia, Di Yang, Sally C. Fletcher, Iolanda Vendrell, Roman Fischer, Arnaud J. Legrand, et Grigory L. Dianov. 2017. « Modulation of Proteostasis Counteracts Oxidative Stress and Affects DNA Base Excision Repair Capacity in ATM-Deficient Cells ». *Nucleic Acids Research* 45 (17): 10042-55. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx635>.

Popanda, Odilia, Reinhard Ebbeler, Dorothee Twardella, Irmgard Helmbold, Florian Gotzes, Peter Schmezer, Heinz Walter Thielmann, et al. 2003. « Radiation-Induced DNA Damage and Repair in Lymphocytes from Breast Cancer Patients and Their Correlation with Acute Skin Reactions to Radiotherapy ». *International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics* 55 (5): 1216-25. [https://doi.org/10.1016/S0360-3016\(02\)04415-2](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(02)04415-2).

Port, Matthias, Francis Hérodin, Marco Valente, Michel Drouet, Andreas Lamkowski, Matthäus Majewski, et Michael Abend. 2017. « Gene Expression Signature for Early Prediction of Late Occurring Pancytopenia in Irradiated Baboons ». *Annals of Hematology* 96 (5): 859-70. <https://doi.org/10.1007/s00277-017-2952-7>.

Port, Matthias, Francis Herodin, Marco Valente, Michel Drouet, Reinhard Ullmann, Sven Doucha-Senf, Andreas Lamkowski, Matthäus Majewski, et Michael Abend. 2016. « MicroRNA Expression for Early Prediction of Late Occurring Hematologic Acute Radiation Syndrome in Baboons ». *PLOS ONE* 11 (11): e0165307. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165307>.

Pouget, Jean-Pierre, Alexandros G. Georgakilas, et Jean-Luc Ravanat. 2018. « Targeted and Off-Target (Bystander and Abscopal) Effects of Radiation Therapy: Redox Mechanisms and Risk/Benefit Analysis ». *Antioxidants & Redox Signaling* 29 (15): 1447-87. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7267>.

Pouliliou, Stamatia E., Theodoros S. Lialiaris, Thespi Dimitriou, Alexandra Giatromanolaki, Dimitrios Papazoglou, Aglaia Pappa, Kyriaki Pistevou, Dimitra Kalamida, et Michael I. Koukourakis. 2015. « Survival Fraction at 2 Gy and γ H2AX Expression Kinetics in Peripheral Blood Lymphocytes From Cancer Patients: Relationship With Acute Radiation-Induced Toxicities ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 92 (3): 667-74. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2015.02.023>.

Prise, K. M., M. Folkard, S. Davies, et B. D. Michael. 1990. « The Irradiation of V79 Mammalian Cells by Protons with Energies below 2 MeV. Part II. Measurement of Oxygen Enhancement Ratios and DNA Damage ». *International Journal of Radiation Biology* 58 (2): 261-77. <https://doi.org/10.1080/09553009014551611>.

Pu, Xinzhu, Zemin Wang, et James E. Klaunig. 2015. « Alkaline Comet Assay for Assessing DNA Damage in Individual Cells ». *Current Protocols in Toxicology* 65 (août): 3.12.1-3.12.11. <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx0312s65>.

Puck, T. T., P. I. Marcus, et S. J. Cieciura. 1956. « Clonal Growth of Mammalian Cells in Vitro; Growth Characteristics of Colonies from Single HeLa Cells with and without a Feeder Layer ». *The Journal of Experimental Medicine* 103 (2): 273-83. <https://doi.org/10.1084/jem.103.2.273>.

Putora, P. M., M. Früh, et L. Kern. 2011. « The Place of Radiotherapy in the Palliative Management of NSCLC ». *Breathe* 8 (2): 134-43. <https://doi.org/10.1183/20734735.012711>.

Quarmby, Steven, Catharine West, Brian Magee, Alan Stewart, Robin Hunter, et Shant Kumar. 2002. « Differential Expression of Cytokine Genes in Fibroblasts Derived from Skin Biopsies of Patients Who Developed Minimal or Severe Normal Tissue Damage after Radiotherapy ». *Radiation Research* 157 (3): 243-48. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2002\)157\[0243:DEOCGI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2002)157[0243:DEOCGI]2.0.CO;2).

Radi, R., J. S. Beckman, K. M. Bush, et B. A. Freeman. 1991. « Peroxynitrite Oxidation of Sulfhydryls. The Cytotoxic Potential of Superoxide and Nitric Oxide ». *The Journal of Biological Chemistry* 266 (7):

4244-50.

Radojcic, M., et N. E. Crompton. 2001. « Age Dependence of T-Lymphocyte Apoptosis Induced by High-Energy Proton Exposure ». *Radiation and Environmental Biophysics* 40 (2): 131-35. <https://doi.org/10.1007/s004110100093>.

Raju, M. R., et S. G. Carpenter. 1978. « A Heavy Particle Comparative Study. Part IV: Acute and Late Reactions ». *The British Journal of Radiology* 51 (609): 720-27. <https://doi.org/10.1259/0007-1285-51-609-720>.

Ravanat, J.-L., et J. Cadet and T. Douki. 2012. « Oxidatively Generated DNA Lesions as Potential Biomarkers of In Vivo Oxidative Stress ». *Current Molecular Medicine*. 30 juin 2012. <https://www.eurekaselect.com/99107/article>.

Reinbold, Julia, Peter Koehler, et Michael Rychlik. 2014. « Quantitation of glutathione and its oxidation products in erythrocytes by multiple-label stable-isotope dilution ». *Analytical Biochemistry* 445 (janvier): 41-48. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.09.029>.

Rieger, Kerri E., Wan-Jen Hong, Virginia Goss Tusher, Jean Tang, Robert Tibshirani, et Gilbert Chu. 2004. « Toxicity from Radiation Therapy Associated with Abnormal Transcriptional Responses to DNA Damage ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (17): 6635-40. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307761101>.

Rithidech, Paiboon Reungpatthanaphong, Louise Honikel, Adam Rusek, et Sanford R. Simon. 2010. « Dose-Rate Effects of Protons on in Vivo Activation of Nuclear Factor-Kappa B and Cytokines in Mouse Bone Marrow Cells ». *Radiation and Environmental Biophysics* 49 (3): 405-19. <https://doi.org/10.1007/s00411-010-0295-z>.

Roberts, C J, G R Morgan, et N Danford. 1997. « Effect of Hormones on the Variation of Radiosensitivity in Females as Measured by Induction of Chromosomal Aberrations. » *Environmental Health Perspectives* 105 (suppl 6): 1467-71. <https://doi.org/10.1289/ehp.97105s61467>.

Robertson, A. B., A. Klungland, T. Rognes, et I. Leiros. 2009. « DNA Repair in Mammalian Cells: Base Excision Repair: The Long and Short of It ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 66 (6): 981-93. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-8736-z>.

Robinson, M. D., D. J. McCarthy, et G. K. Smyth. 2010. « EdgeR: A Bioconductor Package for Differential Expression Analysis of Digital Gene Expression Data ». *Bioinformatics* 26 (1): 139-40. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>.

Robinson, Mark D, et Alicia Oshlack. 2010. « A Scaling Normalization Method for Differential Expression Analysis of RNA-Seq Data ». *Genome Biology* 11 (3): R25. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-3-r25>.

Rødningen, Olaug Kristin, Anne-Lise Børresen-Dale, Jan Alsner, Trevor Hastie, et Jens Overgaard. 2008. « Radiation-Induced Gene Expression in Human Subcutaneous Fibroblasts Is Predictive of Radiation-Induced Fibrosis ». *Radiotherapy and Oncology* 86 (3): 314-20. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2007.09.013>.

Rodríguez-Carrizalez, Adolfo Daniel, José Alberto Castellanos-González, Esaú César Martínez-Romero, Guillermo Miller-Arevillaga, Fermín Paul Pacheco-Moisés, Luis Miguel Román-Pintos, et Alejandra Guillermina Miranda-Díaz. 2016. « The Effect of Ubiquinone and Combined Antioxidant Therapy on Oxidative Stress Markers in Non-Proliferative Diabetic Retinopathy: A Phase IIa, Randomized, Double-Blind, and Placebo-Controlled Study ». *Redox Report: Communications in Free Radical Research* 21 (4): 155-63. <https://doi.org/10.1179/1351000215Y.0000000040>.

- Rodriguez-Gil, J. L., C. Takita, J. Wright, I. M. Reis, W. Zhao, B. E. Lally, et J. J. Hu. 2014. « Inflammatory Biomarker C-Reactive Protein and Radiotherapy-Induced Early Adverse Skin Reactions in Patients with Breast Cancer ». *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 23 (9): 1873-83. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-0263>.
- Romesser, Paul B., Oren Cahlon, Eli Scher, Ying Zhou, Sean L. Berry, Alisa Rybkin, Kevin M. Sine, et al. 2016. « Proton Beam Radiation Therapy Results in Significantly Reduced Toxicity Compared with Intensity-Modulated Radiation Therapy for Head and Neck Tumors That Require Ipsilateral Radiation ». *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 118 (2): 286-92. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2015.12.008>.
- Rosen, Eliot M., Regina Day, et Vijay K. Singh. 2015. « New Approaches to Radiation Protection ». *Frontiers in Oncology* 4. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00381>.
- Rübe, Claudia E., Jan Palm, Michael Erren, Jochen Fleckenstein, Jochem König, Klaus Remberger, et Christian Rübe. 2008. « Cytokine Plasma Levels: Reliable Predictors for Radiation Pneumonitis? » Édité par Nils Cordes. *PLoS ONE* 3 (8): e2898. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002898>.
- Rutz, Hans Peter, Damien C. Weber, Gudrun Goitein, Carmen Ares, Alessandra Bolsi, Antony J. Lomax, Eros Pedroni, Adolf Coray, Eugen B. Hug, et Beate Timmermann. 2008. « Postoperative Spot-Scanning Proton Radiation Therapy for Chordoma and Chondrosarcoma in Children and Adolescents: Initial Experience at Paul Scherrer Institute ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 71 (1): 220-25. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2007.09.014>.
- Sabatier, Al Achkar W, Hoffschir F, Luccioni C, et Dutrillaux B. 1987. « Qualitative Study of Chromosomal Lesions Induced by Neutrons and Neon Ions in Human Lymphocytes at G0 Phase ». *Mutation Research. Mutat Res.* mai 1987. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(87\)90090-x](https://doi.org/10.1016/0027-5107(87)90090-x).
- Sancar, Aziz, Laura A. Lindsey-Boltz, Keziban Unsal-Kaçmaz, et Stuart Linn. 2004. « Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints ». *Annual Review of Biochemistry* 73: 39-85. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723>.
- Sangsuwan, et Haghdoost. 2008. « The Nucleotide Pool, a Target for Low-Dose Gamma-Ray-Induced Oxidative Stress ». *Radiation Research* 170 (6): 776-83. <https://doi.org/10.1667/RR1399.1>.
- Satoh, T. Inada, K. Eguchi, H. Tatsuzaki, T. Kitagawa, et Y. Hirokawa. 1986. « [Studies on relative biological effectiveness and therapeutic gain factor of high energy protons modulated for radiotherapy] ». *Nihon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi. Nippon Acta Radiologica* 46 (5): 714-21.
- Schärer, Orlando D. 2013. « Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (10). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012609>.
- Schmid, T. E., G. Dollinger, A. Hauptner, V. Hable, C. Greubel, S. Auer, A. A. Friedl, M. Molls, et B. Röper. 2009. « No Evidence for a Different RBE between Pulsed and Continuous 20 MeV Protons ». *Radiation Research* 172 (5): 567-74. <https://doi.org/10.1667/RR1539.1>.
- Schnarr, Kara, Douglas Boreham, Jinka Sathya, Jim Julian, et Ian S. Dayes. 2009. « Radiation-Induced Lymphocyte Apoptosis to Predict Radiation Therapy Late Toxicity in Prostate Cancer Patients ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 74 (5): 1424-30. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2008.10.039>.
- Schneider, Uwe, Roger A. Hälgl, Giorgio Baiocco, et Tony Lomax. 2016. « Neutrons in Proton Pencil Beam Scanning: Parameterization of Energy, Quality Factors and RBE ». *Physics in Medicine and Biology* 61 (16): 6231–6242. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/61/16/6231>.
- Scully, Ralph, Arvind Panday, Rajula Elango, et Nicholas A. Willis. 2019. « DNA Double-Strand Break

Repair-Pathway Choice in Somatic Mammalian Cells ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20 (11): 698-714. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0152-0>.

Sethi, Helen A. Shih, Beow Y. Yeap, Kent W. Mouw, Robert Petersen, David Y. Kim, John E. Munzenrider, et al. 2014. « Second Nonocular Tumors among Survivors of Retinoblastoma Treated with Contemporary Photon and Proton Radiotherapy ». *Cancer* 120 (1): 126-33. <https://doi.org/10.1002/cncr.28387>.

Shapiro, et A. Recht. 2001. « Side Effects of Adjuvant Treatment of Breast Cancer ». *The New England Journal of Medicine* 344 (26): 1997-2008. <https://doi.org/10.1056/NEJM200106283442607>.

Sia, Joseph, Radoslaw Szmyd, Eric Hau, et Harriet E. Gee. 2020. « Molecular Mechanisms of Radiation-Induced Cancer Cell Death: A Primer ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8 (février). <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00041>.

Sies, Helmut. 2015. « Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine ». *Redox Biology* 4 (janvier): 180-83. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>.

Singh, N. P., M. T. McCoy, R. R. Tice, et E. L. Schneider. 1988. « A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells ». *Experimental Cell Research* 175 (1): 184-91. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0).

Skiöld, I. Naslund, K. Brehwens, A. Andersson, P. Wersall, E. Lidbrink, M. Harms-Ringdahl, A. Wojcik, et S. Haghdoost. 2013. « Radiation-Induced Stress Response in Peripheral Blood of Breast Cancer Patients Differs between Patients with Severe Acute Skin Reactions and Patients with No Side Effects to Radiotherapy ». *Mutation Research* 756: 152-57. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.04.014>.

Skiöld, Sara, Omid Azimzadeh, Juliane Merl-Pham, Ingemar Naslund, Peter Wersall, Elisabet Lidbrink, Soile Tapio, Mats Harms-Ringdahl, et Siamak Haghdoost. 2015. « Unique Proteomic Signature for Radiation Sensitive Patients; a Comparative Study between Normo-Sensitive and Radiation Sensitive Breast Cancer Patients ». *Mutation Research* 776 (juin): 128-35. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2014.12.002>.

Slater, Jason M., Jerry D. Slater, Joseph I. Kang, Ivan C. Namihas, B. Rodney Jabola, Kelcie Brown, Roger Grove, Cherie Watt, et David A. Bush. 2019. « Hypofractionated Proton Therapy in Early Prostate Cancer: Results of a Phase I/II Trial at Loma Linda University ». *International Journal of Particle Therapy* 6 (1): 1-9. <https://doi.org/10.14338/IJPT-19-00057>.

Song, Sanghyuk, Hyeon Jin Park, Jong Hyung Yoon, Dae Woong Kim, Jeonghoon Park, Dongho Shin, Sang Hoon Shin, et al. 2014. « Proton Beam Therapy Reduces the Incidence of Acute Haematological and Gastrointestinal Toxicities Associated with Craniospinal Irradiation in Pediatric Brain Tumors ». *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)* 53 (9): 1158-64. <https://doi.org/10.3109/0284186X.2014.887225>.

Soussi, T. 1998. « Mdm2 et p53 : une association mortelle pour mieux préserver l'intégrité de l'ADN. » *M/S. Médecine sciences [revue papier, ISSN: 0767-0974], 1998, Vol. 14, N° 5; p.656-7.* <https://doi.org/10.4267/10608/1112>.

Spitz, Douglas R., Edouard I. Azzam, Jian Jian Li, et David Gius. 2004. « Metabolic Oxidation/Reduction Reactions and Cellular Responses to Ionizing Radiation: A Unifying Concept in Stress Response Biology ». *Cancer Metastasis Reviews* 23 (3-4): 311-22. <https://doi.org/10.1023/B:CANC.0000031769.14728.bc>.

St. James, Sara, Clemens Grassberger, et Hsiao-Ming Lu. 2018. « Considerations when treating lung cancer with passive scatter or active scanning proton therapy ». *Translational Lung Cancer Research* 7

(2): 210-15. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2018.04.01>.

Stadtman, E. R. 1993. « Oxidation of Free Amino Acids and Amino Acid Residues in Proteins by Radiolysis and by Metal-Catalyzed Reactions ». *Annual Review of Biochemistry* 62: 797-821. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.62.070193.004053>.

Stenmark, Matthew H., Xu-Wei Cai, Kerby Shedden, James A. Hayman, Shuanghu Yuan, Timothy Ritter, Randall K. Ten Haken, Theodore S. Lawrence, et Feng-Ming Spring Kong. 2012. « Combining Physical and Biologic Parameters to Predict Radiation-Induced Lung Toxicity in Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer Treated with Definitive Radiation Therapy ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 84 (2): e217-222. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2012.03.067>.

Sténson, S. 1969a. « Effects of Proton and Roentgen Radiation on the Rectum of the Rat ». *Acta Radiologica: Therapy, Physics, Biology* 8 (4): 263-78. <https://doi.org/10.3109/02841866909134458>.

———. 1969b. « Weight Change and Mortality of Rats after Abdominal Proton and Roentgen Irradiation. A Comparative Investigation ». *Acta Radiologica: Therapy, Physics, Biology* 8 (5): 423-32. <https://doi.org/10.3109/02841866909134469>.

Suit, Herman D., Anthony E. Howes, et Nancy Hunter. 1977. « Dependence of Response of a C3H Mammary Carcinoma to Fractionated Irradiation on Fractionation Number and Intertreatment Interval ». *Radiation Research* 72 (3): 440-54. <https://doi.org/10.2307/3574609>.

Suman, S, S Kumar, AJ Fornace, et K Datta. 2017. « Persistent oxidative stress in mouse intestinal and colonic epithelial cells after exposure to 12C-ion radiation ». *American Association for Cancer Research* 77 (13): Suppl.

Svensson, J. Peter, Lukas J. A. Stalpers, Rebecca E. E. Esveldt-van Lange, Nicolaas A. P. Franken, Jaap Haveman, Binie Klein, Ingela Turesson, Harry Vrieling, et Micheline Giphart-Gassler. 2006. « Analysis of Gene Expression Using Gene Sets Discriminates Cancer Patients with and without Late Radiation Toxicity ». *PLoS Medicine* 3 (10): e422. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030422>.

Taheri-Kadkhoda, Zahra, Thomas Björk-Eriksson, Simeon Nill, Jan J. Wilkens, Uwe Oelfke, Karl-Axel Johansson, Peter E. Huber, et Marc W. Münter. 2008. « Intensity-modulated radiotherapy of nasopharyngeal carcinoma: a comparative treatment planning study of photons and protons ». *Radiation Oncology* 3 (1): 4. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-3-4>.

Taketa, S. T., B. L. Castle, W. H. Howard, C. C. Conley, W. Haymaker, et C. A. Sondhaus. 1967. « Effects of Acute Exposure to High-Energy Protons on Primates ». *Radiation Research. Supplement 7*: 336-59.

Tapio. 2013. « Ionizing Radiation Effects on Cells, Organelles and Tissues on Proteome Level ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 990: 37-48. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5896-4_2.

Tartier, Laurence, Catherine Spenlehauer, Heidi C. Newman, Melvyn Folkard, Kevin M. Prise, Barry D. Michael, Josiane Ménissier-de Murcia, et Gilbert de Murcia. 2003. « Local DNA Damage by Proton Microbeam Irradiation Induces Poly(ADP-Ribose) Synthesis in Mammalian Cells ». *Mutagenesis* 18 (5): 411-16.

Tatsuzaki, T. Arimoto, T. Inada, Y. Uwamino, T. Nakamura, M. Yaguchi, et M. Akisada. 1991. « Early Skin Reaction Following Superficial Proton Irradiation ». *Journal of Radiation Research* 32 (2): 175-80. <https://doi.org/10.1269/jrr.32.175>.

Tatsuzaki, Tetsuo Inada, Takeshi Shimizu, Takuro Arimoto, Shinichiro Satoh, et Masayoshi Akisada. 1987. « Early Skin Reaction Following 250 MeV Proton Peak Irradiation ». *Journal of Radiation*

Research 28 (2): 150-55. <https://doi.org/10.1269/jrr.28.150>.

Tepper, J., L. Verhey, M. Goitein, et H. D. Suit. 1977. « In Vivo Determinations of RBE in a High Energy Modulated Proton Beam Using Normal Tissue Reactions and Fractionated Dose Schedules ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 2 (11-12): 1115-22. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(77\)90118-3](https://doi.org/10.1016/0360-3016(77)90118-3).

Tie, Yi, Zheng Hu, GuiXiang Lü, HanJiang Fu, RuiYun Xing, Jie Zhu, ZhiXian Sun, et XiaoFei Zheng. 2011. « Novel Method for Ionizing Radiation-Induced RNA Damage Detection by Poly(A)-Tailing RT-PCR ». *Chinese Science Bulletin Kexue Tongbao*. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201400107934>.

Tobias, C. A., H. O. Anger, et J. H. Lawrence. 1952. « Radiological Use of High Energy Deuterons and Alpha Particles ». *The American Journal of Roentgenology, Radium Therapy, and Nuclear Medicine* 67 (1): 1-27.

Tommasino, Francesco, et Marco Durante. 2015. « Proton Radiobiology ». *Cancers* 7 (1): 353-81. <https://doi.org/10.3390/cancers7010353>.

Tsujiaki, M., K. Imai, H. Hirata, Y. Hanzawa, J. Masuya, T. Nakano, T. Sugiyama, M. Matsui, Y. Hinoda, et A. Yachi. 1991. « Detection of Circulating Intercellular Adhesion Molecule-1 Antigen in Malignant Diseases ». *Clinical and Experimental Immunology* 85 (1): 3-8.

Tubiana, Maurice, Dietrich Averback, Michel Bourguignon, Jean Bourhis, Jean-Jacques Cassiman, Jean-Marc Cosset, Vincent Favaudon, et al. 2008. « RADIOBIOLOGIE RADIOTHERAPIE ET RADIOPROTECTION Bases Fondamentales ». In *RADIOBIOLOGIE RADIOTHERAPIE ET RADIOPROTECTION Bases Fondamentales*. <https://www.livres-medicaux.com/radiobiologie-radiotherapie-et-radioprotection-bases-fondamentales.html>.

Tucker. 2008. « Low-Dose Ionizing Radiation and Chromosome Translocations: A Review of the Major Considerations for Human Biological Dosimetry ». *Mutation Research. Mutat Res.* octobre 2008. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.04.001>.

Tucker, et Luckinbill. 2011. « Estimating the Lowest Detectable Dose of Ionizing Radiation by FISH Whole-Chromosome Painting ». *Radiation Research. Radiat Res.* mai 2011. <https://doi.org/10.1667/RR2506.1>.

Turesson, I., J. Nyman, E. Holmberg, et A. Odén. 1996. « Prognostic Factors for Acute and Late Skin Reactions in Radiotherapy Patients ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 36 (5): 1065-75. [https://doi.org/10.1016/s0360-3016\(96\)00426-9](https://doi.org/10.1016/s0360-3016(96)00426-9).

Urano, M., L. J. Verhey, M. Goitein, J. E. Tepper, H. D. Suit, O. Mendiondo, E. S. Gragoudas, et A. Koehler. 1984. « Relative Biological Effectiveness of Modulated Proton Beams in Various Murine Tissues ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 10 (4): 509-14. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(84\)90031-2](https://doi.org/10.1016/0360-3016(84)90031-2).

Vakifahmetoglu, H., M. Olsson, et B. Zhivotovsky. 2008. « Death through a Tragedy: Mitotic Catastrophe ». *Cell Death & Differentiation* 15 (7): 1153-62. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.47>.

Valko, Dieter Leibfritz, Jan Moncol, Mark T. D. Cronin, Milan Mazur, et Joshua Telser. 2007. « Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (1): 44-84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>.

Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, et M. Mazur. 2006. « Free Radicals, Metals and Antioxidants in Oxidative Stress-Induced Cancer ». *Chemico-Biological Interactions* 160 (1): 1-40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>.

- Viswanathan, Vidhya, Kamnesh R. Pradhan, et Erica A. Eugster. 2011. « PITUITARY HORMONE DYSFUNCTION AFTER PROTON BEAM RADIATION THERAPY IN CHILDREN WITH BRAIN TUMORS ». *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists* 17 (6): 891-96. <https://doi.org/10.4158/EP10391.OR>.
- Voets, An M., Cary Oberije, Robin B. Struijk, Bart Reymen, Kim De Ruyck, Hubert Thierens, Katrien Vandecasteele, et al. 2012. « No Association between TGF-B1 Polymorphisms and Radiation-Induced Lung Toxicity in a European Cohort of Lung Cancer Patients ». *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 105 (3): 296-98. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2012.09.016>.
- Vogin, Guillaume, et Nicolas Foray. 2013. « The Law of Bergonié and Tribondeau: A Nice Formula for a First Approximation ». *International Journal of Radiation Biology* 89 (1): 2-8. <https://doi.org/10.3109/09553002.2012.717732>.
- Vorotnikova, Ekaterina, Rosalind A. Rosenthal, Mark Tries, Susan R. Doctrow, et Susan J. Braunhut. 2010. « Novel Synthetic SOD/Catalase Mimetics Can Mitigate Capillary Endothelial Cell Apoptosis Caused by Ionizing Radiation ». *Radiation research* 173 (6): 748-59. <https://doi.org/10.1667/RR1948.1>.
- Vral, Anne, Michael Fenech, et Hubert Thierens. 2011. « The Micronucleus Assay as a Biological Dosimeter of in Vivo Ionising Radiation Exposure ». *Mutagenesis* 26 (1): 11-17. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq078>.
- Wan, X. S., P. Bloch, J. H. Ware, Z. Zhou, J. J. Donahue, J. Guan, J. Stewart, et A. R. Kennedy. 2005. « Detection of Oxidative Stress Induced by Low- and High-Linear Energy Transfer Radiation in Cultured Human Epithelial Cells ». *Radiat Res* 163 (4): 364-68.
- Wan, X. S., J. H. Ware, Z. Zhou, J. J. Donahue, J. Guan, et A. R. Kennedy. 2006. « Protection against Radiation-Induced Oxidative Stress in Cultured Human Epithelial Cells by Treatment with Antioxidant Agents ». *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 64 (5): 1475-81. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2005.11.024>.
- Wang, Dongxu. 2015. « A critical appraisal of the clinical utility of proton therapy in oncology ». *Medical Devices (Auckland, N.Z.)* 8 (octobre): 439-46. <https://doi.org/10.2147/MDER.S65594>.
- Ward, J.F. 1988. « DNA Damage Produced by Ionizing Radiation in Mammalian Cells: Identities, Mechanisms of Formation, and Reparability ». In *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, édité par W.E. Cohn et K. Moldave, 35:95-125. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)60611-X](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)60611-X).
- Warren, D. J., L. Slørdal, et M. A. Moore. 1990. « Tumor-Necrosis Factor Induces Cell Cycle Arrest in Multipotential Hematopoietic Stem Cells: A Possible Radioprotective Mechanism ». *European Journal of Haematology* 45 (3): 158-63. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1990.tb00444.x>.
- Warshaw, S. D., et D. G. Oldfield. 1957. « Pre-Therapeutic Studies with the Chicago Synchrocyclotron ». *The American Journal of Roentgenology, Radium Therapy, and Nuclear Medicine* 78 (5): 876-86.
- Wei, Bin Wang, Huanhuan Wang, Lingbin Meng, Qin Zhao, Xinyu Li, Ying Xin, et Xin Jiang. 2019. « Radiation-Induced Normal Tissue Damage: Oxidative Stress and Epigenetic Mechanisms ». Review Article. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi. 12 novembre 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3010342>.
- Widesott, Lamberto, Maurizio Amichetti, et Marco Schwarz. 2008. « Proton Therapy in Lung Cancer: Clinical Outcomes and Technical Issues. A Systematic Review ». *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 86 (2): 154-64.

<https://doi.org/10.1016/j.radonc.2008.01.003>.

Wilson, Robert R. 1946. « Radiological Use of Fast Protons ». *Radiology* 47 (5): 487-91. <https://doi.org/10.1148/47.5.487>.

Xiong, Huihua, Zhongxing Liao, Zhensheng Liu, Ting Xu, Qiming Wang, Hongliang Liu, Ritsuko Komaki, Daniel Gomez, Li-E Wang, et Qingyi Wei. 2013. « ATM Polymorphisms Predict Severe Radiation Pneumonitis in Patients With Non-Small Cell Lung Cancer Treated With Definitive Radiation Therapy ». *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* 85 (4): 1066-73. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2012.09.024>.

Xue, Xiao-Lei, Xiao-Dan Han, Yuan Li, Xiao-Fei Chu, Wei-Min Miao, Jun-Ling Zhang, et Sai-Jun Fan. 2017. « Astaxanthin Attenuates Total Body Irradiation-Induced Hematopoietic System Injury in Mice via Inhibition of Oxidative Stress and Apoptosis ». *Stem Cell Research & Therapy* 8 (1): 7. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0464-3>.

Yamashita, Satoshi, et Yorihiro Yamamoto. 1997. « Simultaneous Detection of Ubiquinol and Ubiquinone in Human Plasma as a Marker of Oxidative Stress ». *Analytical Biochemistry* 250 (1): 66-73. <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2187>.

Yock, Sundeep Bhat, Jackie Szymonifka, Beow Y. Yeap, Jennifer Delahaye, Sarah S. Donaldson, Shannon M. MacDonald, et al. 2014. « Quality of Life Outcomes in Proton and Photon Treated Pediatric Brain Tumor Survivors ». *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 113 (1): 89-94. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2014.08.017>.

Yock, B. Y. Yeap, D. H. Ebb, E. Weyman, B. R. Eaton, N. A. Sherry, R. M. Jones, et al. 2016. « Long-Term Toxic Effects of Proton Radiotherapy for Paediatric Medulloblastoma: A Phase 2 Single-Arm Study ». *Lancet Oncol* 17 (3): 287-98. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00167-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00167-9).

Zellmer, R., J. Culver, et J. E. Pickering. 1967. « Proton-Irradiation Effects in Primates ». *Radiation Research. Supplement* 7: 325-29.

Zhao, Lujun, Kerby Sheldon, Ming Chen, Moli S. Yin, James A. Hayman, Gregory P. Kalemkerian, Doug Arenberg, et al. 2008. « The Predictive Role of Plasma TGF-B1 during Radiation Therapy for Radiation-Induced Lung Toxicity Deserves Further Study in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer ». *Lung Cancer* 59 (2): 232-39. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2007.08.010>.

Zhao, Hong-jin Qu, Jia-ming Guo, Hai-nan Zhao, Yan-yong Yang, Pei Zhang, Kun Cao, et al. 2016. « Protective Effects of Myrtol Standardized Against Radiation-Induced Lung Injury ». *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* 38 (2): 619-34. <https://doi.org/10.1159/000438655>.

Zhou, Hongning, Mei Hong, Yunfei Chai, et Tom K. Hei. 2009. « Consequences of Cytoplasmic Irradiation: Studies from Microbeam ». *Journal of radiation research* 50 (0 0): A59-65.

ANNEXES

Communications

- **Communications orales :**

- Chaouni S, De Marzi L, Pouzoulet F, Sichel F, Habrand J-L, Stefan D, Lecomte D, Laurent C. Side effects of scattered versus scanned proton beams on normal tissues in total body irradiated mice: preliminary results. Environmental Mutagenesis and Genomics Society – 12-16/09/20 : congrès virtuel.
- Chaouni S, Dumont D, Stefan D, Leduc A, Barraux V, Leconte A, Grellard J-M, Habrand J-L, Guillamin M, Sichel F, Laurent C. Possibility of using genotoxicity, oxidative stress and inflammation blood biomarkers to predict the occurrence of late cutaneous side effects after radiotherapy. European Environmental Mutagenesis & Genomic Society –05-08/05/2020 Porto; Portugal - *Early Career travel grant* – Annulé Covid-19.
- Chaouni S, De Marzi L, Pouzoulet F, Sichel F, Habrand J-L, Stefan D, Lecomte D, Laurent C. ESPRITS (Effets Secondaires de la PRotonthérapie Liés à l'Irradiation des Tissus Sains). Société Française de Toxicologie Génétique – 1-2/10/2018 – Paris ; France.
- Chaouni S, De Marzi L, Pouzoulet F, Sichel F, Habrand J-L, Stefan D, Lecomte D, Laurent C. Side effects of scattered versus scanned proton beams on normal tissues in total body irradiated mice: preliminary results. International Workshop on Radiation Damage to DNA – 27/05-01/06/2018 – Aussois ; France - *Bourse de mobilité de l'école doctorale*.
- Chaouni S, De Marzi L, Pouzoulet F, Habrand JL, Sichel F, Stefan D, Lecomte D, Laurent C. ESPRITS (Effets Secondaires de la PRotonthérapie liés à l'Irradiation des Tissus Sains). 11èmes Journées Scientifiques du CNO (Cancéropôle Nord-Ouest), Deauville, 2018.
- Chaouni S, De Marzi L, Pouzoulet F, Sichel F, Habrand J-L, Stefan D, Lecomte D, Laurent C. Secondary effects of protontherapy due to healthy tissue irradiation: ESPRITS program. Journées de l'École Doctorale - 23-24/03/2018 – Rouen ; France.
- Chaouni S, De Marzi L, Pouzoulet F, Sichel F, Habrand J-L, Stefan D, Lecomte D, Laurent C. Programme ESPRITS : Effets Secondaires de la PRotonthérapie liés à l'Irradiation. Cancéropôle Nord-Ouest - Réunion de l'Axe 3 « Imagerie fonctionnelle et Radiothérapie » – 01/12/2017 – Caen ; France.

- **Communications affichées :**

- Chaouni S, Dumont D, Stefan D, Leduc A, Barraux V, Leconte A, Grellard J-M, Habrand J-L, Guillamin M, Sichel F, Laurent C. Side effects of scatted versus scanned proton beams

on normal tissues in total body irradiated mice. European Radiation Research Society 13-17/09/2020 – Digital Meeting- *Young Investigator Award*.

- Chaouni S, Dumont D, Stefan D, Leduc A, Barraux V, Leconte A, Grellard J-M, Habrand J-L, Guillamin M, Sichel F, Laurent C. Side effects of scattered versus scanned proton beams on normal tissues in total body irradiated mice. European Environmental Mutagenesis & Genomic Society – 05-08/05/2020 – Porto; Portugal - Annulé Covid-19 – *Early Career Travel Grant*.
- Chaouni S, De Marzi L, Pouzoulet F, Habrand J-L, Sichel F, Stefan D, Megnin-Chanet F, Laurent C. Programme ESPRITS : Modification de la survie, de la génotoxicité et du stress oxydatif dans les tissus sains chez la souris irradiée par des faisceaux de protons balayés versus diffusés. CNO 2020 : Cancéropôle Nord-Ouest – 19 au 21/05/2020 – Deauville ; France - Annulé Covid-19.
- Ezine E, Chaouni S, Stefan D, Pouzoulet F, Megnin-Chanet F, De Marzi L, Habrand J-L, Sichel F, Laurent C. Projet ToxiP3 : Toxicité comparée des traitements combinés par inhibiteurs de PARP et radiothérapie conventionnelle (photons) ou protonthérapie par faisceaux balayés. Cancéropôle Nord-Ouest – 19 au 21/05/2020 – Deauville ; France - Annulé Covid-19.
- Iamarene N, Chaouni S, De Marzi L, Pouzoulet F, Habrand J-L, Sichel F, Stefan D, Megnin-Chanet F, Laurent C. Phénomènes oxydatifs pulmonaires et cardiaques chez la souris irradiée corps entier par des faisceaux de protons balayés versus diffusés. Cancéropôle Nord-Ouest - 19 au 21/05/2020 – Deauville ; France - Annulé Covid-19.
- Chaouni S, De Marzi L, Pouzoulet F, Sichel, Habrand J-L, Stefan D, Lecomte D, Laurent C. Programme ESPRITS : Modification de la survie, de la génotoxicité et du stress oxydatif dans les tissus sains chez la souris irradiée par des faisceaux de protons balayés versus diffusés. Journée Normande pour la Recherche Biomédicale – 19/11/2019 – Caen ; France.
- Leduc A, Chaouni S, De Marzi L, Pouzoulet F, Corre E, Sichel F, Habrand JL, Stefan D, Megnin-Chanet F, Laurent C. Programme ESPRITS : Mise en évidence d’une modulation de la réponse transcriptomique dans la peau de souris irradiées par des faisceaux de protons balayés versus diffusés – Résultats préliminaires. Journée Normande de Recherche Biomédicale, Caen, 2019.
- Lecomte Dumont D, Stefan D, Chaouni S, Sichel F, Habrand JL, Laurent C. Etude clinique PAESCART : Prédiction de l'Apparition d'Effets Secondaires Cutanés tardifs Après RadioThérapie. Journée Normande de Recherche Biomédicale, Caen, 2019.

- Chaouni S, De Marzi L, Pouzoulet F, Sichel F, Habrand J-L, Stefan D, Lecomte D, Laurent C. Side effects of scattered versus scanned proton beams on normal tissues in total body irradiated mice. International Congress of Radiation Research – 24-30/08/2019 – Manchester, Angleterre.
- Chaouni S, De Marzi L, Pouzoulet F, Sichel F, Habrand J-L, Stefan D, Lecomte D, Laurent C. Side effects of scattered versus scanned proton beams on normal tissues in total body irradiated mice. EEMGS: European Environmental Mutagenesis & Genomic Society - 19-23/05/2019 – Rennes - **Early Career travel grant**.
- Lecomte D, Stefan D, Chaouni S, Sichel F, Habrand J-L, Barraux V, Laurent C. Use of genotoxicity, oxidative stress and inflammation blood markers to predict the occurrence of late cutaneous side effects after radiotherapy in Merkel Cell Carcinomas patients. EEMGS: European Environmental Mutagenesis & Genomic Society – 19-23/05/2019 – Rennes; France.
- Chaouni S, De Marzi L, Pouzoulet F, Sichel F, Habrand J-L, Stefan D, Lecomte D, Laurent C. Side effects of scattered versus scanned proton beams on normal tissues in total body irradiated mice: preliminary results. Journées de l'Ecole Doctorale –21-22/03/2019 – Caen.
- Chaouni S, De Marzi L, Pouzoulet F, Sichel F, Habrand J-L, Stefan D, Lecomte D, Laurent C. Side effects of scattered versus scanned proton beams on normal tissues in total body irradiated mice: preliminary results. International Marie Sklodowska Curie Meeting – 12/10/2018– Paris; France.
- Chaouni S, De Marzi L, Pouzoulet F, Sichel F, Habrand J-L, Stefan D, Lecomte D, Laurent C. ESPRITS (Effets Secondaires de la PRotonthérapie liés à l'Irradiation des Tissus Sains). Journée Normande de la Recherche Médicale – 20/09/2018 – Rouen.
- Chaouni S, De Marzi L, Pouzoulet F, Sichel F, Habrand J-L, Stefan D, Lecomte D et Laurent C. Programme ESPRITS : Effets Secondaires de la PRotonthérapie liés à l'Irradiation des Tissus Sains. 11ème journée scientifique du Cancéropôle Nord-Ouest – 23-25/05/2018 – Deauville ; France (**Bourse de mobilité jeune chercheur**).
- Chaouni S, De Marzi L, Pouzoulet F, Sichel F, Habrand J-L, Stefan D, Lecomte D, Laurent C. Programme ESPRITS : Effets Secondaires de la PRotonthérapie liés à l'Irradiation des Tissus Sains. Journée Normande de la Recherche Biomédicale – 14/11/2017 – Caen ; France.

Formations

Formations doctorales :

- Module « **Communication et savoir être** »
 - Intégrité scientifique (4h)
 - Base d'anglais pour chercheur (8h)
- Module « **Méthodologie & outils de la thèse** »
 - Zotero : « Initiation au logiciel de gestion des références bibliographiques » (6h)
 - GIMP : « Savoir créer des figures et illustrations pour publier des articles et rédiger sa thèse » (12h)
- Module « **Recherche et Enseignement Supérieur** » : **Ecole Supérieur du Professorat et de l'Éducation**
 - Nouvelles formes d'apprentissage et numérique (3h)
 - Voix, corps et communication professionnelle (6h)
 - Evaluation et formation des étudiants (3h)
 - Sociologie des publics étudiants (3h)

Autres formations :

- DU « radiobiologie et radioprotection en radiothérapie », *Institut Gustave Roussy, Villejuif (105h)*.
- DU Expérimentation Animale appliquée à la recherche biomédicale : conception des projets utilisant des rongeurs à des fins scientifiques- *Cycéron, Caen (72h)*.
- Formation à l'utilisation du microscope couplé à un système d'acquisition et d'analyse d'images Metasystems, *Laboratoire ABTE, Caen (32h)*.
- Formation à l'utilisation du Cytoflex- Plateforme ICORE (8h)

Manifestations scientifiques :

- Ma thèse en 180 secondes
- Fête de la science, Laboratoire ABTE, IUT de Caen, Bâtiment Science 2 – 6 au 14 Octobre 2018 « Portes ouvertes » , découverte du laboratoire de recherche au grand public

➔ 162 heures validées par l'Ecole Doctorale

Mission enseignement

✓ **Avenant contrat doctoral 2018-2019 :**

UFR Pharmacie-Caen :

- Travaux Dirigés Oncologie (DFA SP1) : 4,5 HETD (*chimiothérapies, analyse d'articles scientifiques*).
- Travaux Pratiques Toxicologie Clinique (DFA SP1) : 32 HETD (*culture cellulaire, toxicité du cisplatine, dosages biochimiques, immunofluorescence, microscopie*). Co-encadrement des séances de TP avec le Dr Mathilde Lechevrel.
- Travaux pratiques Bioanalyse (DFA SP2) : 4,5 HETD (*culture cellulaire, microscopie*). Co-encadrement des séances de TP avec le Dr Véronique André.

IUT Génie Biologique-Caen :

- Travaux dirigés & Travaux Pratiques Toxicologie et pharmacologie (2ème année parcours "Analyses Biologiques et Biochimiques") : 16 HETD (*expérimentation animale, cultures primaires, test des micronoyaux, mise en place avec le Dr Carine Laurent d'un TP sur le test des comètes*).

✓ **Avenant contrat doctoral 2019-2020 :**

UFR Pharmacie-Caen :

- Travaux dirigés Oncologie (DFA SP1) : 4,5 HETD (*chimiothérapies, analyse d'articles scientifiques*).
- Travaux Pratiques Toxicologie Clinique (DFA SP1) : 56 HETD (*culture cellulaire, toxicité du cisplatine, dosages biochimiques, immunofluorescence, microscopie*). Co-encadrement des séances de TP avec le Dr Mathilde Lechevrel.

Encadrement de stagiaires

- 1- Co-encadrement d'un stage de Master 2 parcours « Cancer, différenciation génétique et biothérapies » (CDG-Biother) d'une durée de 6 mois avec le Dr Carine Laurent ; Janvier-Juin 2020 (Nadira Iamarene).
- 2- Co-encadrement d'un stage de Master 2 parcours « Cancer, différenciation génétique et biothérapies » (CDG-Biother) d'une durée de 6 mois avec le Dr Carine Laurent ; Janvier-Juin 2020 (Emilien Ezine).
- 3- Co-encadrement d'un stage de Master 1 parcours « Biologie Santé » d'une durée de 8 semaines avec le Dr Carine Laurent ; Mai-Juin 2018 (Nadira Iamarene).
- 4- Co-encadrement d'un stage d'observation d'une durée d'une semaine ; Lycée avec Dr Carine Laurent ; Janvier 2020 (Axel Corroler).
- 5- Co-encadrement d'un stage d'observation » d'une durée de 2 semaines ; niveau Licence 3 avec le Dr Carine Laurent ; Avril 2018 (Marie-Céline Lambert).
- 6- Co-encadrement d'un stage d'observation d'une durée d'une semaine ; Lycée avec Dr Carine Laurent ; Avril 2018 (Violette Gente).

Activités administratives

- Participation aux Comités de Suivi Individuel (CSI) de thèse de 4 doctorants :
 - Quentin Noguès (Laboratoire BOREA)
 - Mohammad Ahmad (Laboratoire ANTICIPE)
 - François Gernier (Laboratoire ANTICIPE)
 - Gilles Loggia (Laboratoire COMETE)

- Représentante des doctorants et post-doctorants élue au conseil de gestion de l'unité de recherche ABTE-EA4651

Résumé

Malgré les améliorations apportées, la radiothérapie conventionnelle et la protonthérapie continuent d'engendrer des toxicités sur les tissus sains. Nous avons cherché ici à évaluer les effets de l'irradiation sur les tissus sains par le biais de biomarqueurs sanguins et tissulaires chez des patients traités par radiothérapie conventionnelle ainsi que sur des modèles murins exposés à des faisceaux de protons diffusés, technique de délivrance passive du faisceau, ou balayés, nouvelle technique conduisant à une délivrance de la dose complètement différente. Nous avons pu mettre en évidence des différences de réponse dans le sang des patients les plus radiosensibles avec une diminution de l'apoptose, de la génotoxicité et de la capacité antioxydante et une augmentation de l'inflammation. Sur les modèles murins, l'irradiation par les faisceaux de protons balayés conduit de manière générale à une augmentation de la génotoxicité, de la capacité antioxydante, de la carbonylation des protéines et de l'inflammation. Une grande disparité est observée selon les tissus. L'étude transcriptomique (ARNm et ARNnc) de la peau met en avant la voie de la kératinisation qui semble prépondérante après un faisceau de protons balayés. Il apparaît donc primordial de prendre en compte la spécificité de chaque tissu et la modalité de délivrance des faisceaux de protons. Les perspectives sont de pouvoir mesurer les biomarqueurs mis en avant dans ces travaux chez des patients traités par protonthérapie et d'utiliser ces connaissances pour prédire les effets secondaires et améliorer les traitements par radiothérapie conventionnelle et protonthérapie.

Abstract

Despite the improvements made, conventional radiotherapy and protontherapy continue to cause toxicities in healthy tissues. We sought here to evaluate the effects of irradiation on healthy tissues through blood and tissue biomarkers in patients treated with conventional radiotherapy as well as in mouse models exposed to scattered proton beams, a technique for passive delivery of the beam, or scanned proton beams, a new technique leading to a completely different dose delivery. We were able to demonstrate differences in biological response in the blood of the most radiosensitive patients with a decrease in apoptosis, genotoxicity and antioxidant capacity and an increase in inflammation. In mouse models, irradiation by scanned proton beams generally leads to increased genotoxicity, antioxidant capacity, protein carbonylation, and inflammation. A great disparity is observed according to the tissues. The transcriptomic study (mRNA and ncRNA) of the skin highlights the pathway of keratinization which seems to be dominant after scanned proton beams. It therefore appears essential to take into account the specificity of each tissue and the mode of delivery of the proton beams. The prospects are to be able to measure the biomarkers highlighted in this work in patients treated with protontherapy and to use this knowledge to predict side effects and improve treatments by conventional radiotherapy and protontherapy.