

THÈSE

Présentée à

L'Université de Lille I Sciences et Technologies
Ecole Doctorale ED SPI 072

Pour Obtenir le Grade de Docteur de l'Université

Discipline **Science pour l'Ingénieur**
Spécialité **Micro et Nano Technologies**

RADIOTHÉRAPIE DU CANCER: DE LA PHYSIQUE DE L'ADN IRRADIÉ À LA DORMANCE TUMORALE

Par

Maxime TOMEZAK

Soutenue publiquement le 6 décembre 2016

Composition du Jury:

Dr. Laure SABATIER	CEA, Fontenay-aux-Roses	<i>Rapporteur</i>
Prof. Enrico CARLON	Département de Physique, Université Catholique de Louvain (Belgique)	<i>Rapporteur</i>
Dr. Prof. Eric LARTIGAU	Centre de Lutte Contre le Cancer "Oscar Lambret", Lille	<i>Examineur</i>
Dr. Jean-Luc RAVANAT	CEA, Grenoble	<i>Examineur</i>
Dr. Janet HALL	Centre de Rech. Cancerologie, Lyon	<i>Examineur</i>
Prof. Corinne ABBADIE	IBL et UFR de Biologie, Université de Lille I	<i>Directeur de thèse</i>
Prof. Fabrizio CLERI	IEMN et UFR de Physique, Université de Lille I	<i>Directeur de thèse</i>

THESIS

N. 42263

Presented to the

University of Lille I Sciences and Technologies
Doctoral School ED SPI 072

To Obtain the Degree of Doctor of the University

Discipline **Sciences for Engineering**
Specialty **Micro and Nano Technologies**

CANCER RADIOTHERAPY: FROM THE PHYSICS OF IRRADIATED DNA TO TUMOR DORMANCY

By

Maxime TOMEZAK

Publicly defended the 6 december 2016

Composition of the Jury:

Dr. Laure SABATIER	CEA, Fontenay-aux-Roses	<i>Reviewer</i>
Prof. Enrico CARLON	Physics Department, Catholic University, Leuven (Belgium)	<i>Reviewer</i>
Dr. Prof. Eric LARTIGAU	Centre de Lutte Contre le Cancer "Oscar Lambret", Lille	<i>Examiner</i>
Dr. Jean-Luc RAVANAT	CEA, Grenoble	<i>Examiner</i>
Dr. Janet HALL	Centre de Rech. Cancerologie, Lyon	<i>Examiner</i>
Prof. Corinne ABBADIE	IBL and Biology Department, University of Lille I	<i>Advisor</i>
Prof. Fabrizio CLERI	IEMN and Physics Department, University of Lille I	<i>Advisor</i>

RÉSUMÉ

Radiothérapie du cancer: de la physique de l'ADN irradié à la dormance tumorale

La radiothérapie utilise les rayonnements ionisants dans le but d'éradiquer les cellules cancéreuses, principalement par la génération de cassures double-brin (CDB) de l'ADN, et secondairement de cassures simple-brin (CSB). Un des effets secondaires de la radiothérapie est l'émergence de seconds cancers, préférentiellement en bordure du volume traité, où des cellules normales reçoivent un niveau de dose non létal. Ces seconds sarcomes se développent principalement après une période de latence de 3 à 20 ans. Par le biais d'expériences de biologie cellulaire, nous avons déterminé la distribution des dommages à l'ADN (CSB et CDB) dans le champ d'irradiation, et en bordure de celui-ci, après différentes conditions d'irradiation. Nous avons aussi évalué les dommages à l'ADN et l'induction de sénescence après un traitement fractionné. La détection des foyers XRCC1 et 53BP1 par immunofluorescence a été utilisée comme marqueurs des CSB et CDB respectivement. Enfin, la sénescence a été évaluée par la mesure de l'activité de l'enzyme SA-beta-galactosidase. Nous avons en parallèle développé un modèle théorique d'évolution cellulaire, avec pour objectif le suivi des cellules après l'action d'un traitement génotoxique, tel que la radiothérapie ou la chimiothérapie. Les caractéristiques principales de cycle cellulaire, d'endommagement et de réparation de l'ADN, et de la diffusion chimique ont été incluses dans ce modèle, basé sur la méthode statistique des « agents » et résolution stochastique par méthode Monte Carlo ; l'évolution cellulaire est décrite par des chaînes de Markov. Deux applications du modèle sont présentées : courbes de survie cellulaire et simulation de l'effet « bystander ».

Mots clés : radiobiologie, cancer radio-induits, dommages à l'ADN, sénescence, modélisation de population cellulaire, modèles statistiques.

ABSTRACT

Cancer radiotherapy: from the physics of irradiated DNA to tumor dormancy

Radiotherapy uses ionizing radiations in order to eradicate cancer cells mainly through the generation of DNA double-strand breaks (DSB), and with a lesser effect single-strand breaks (SSB). A side effect of radiotherapy is the emergence of second cancers, preferentially at the border of the treated volume, where normal cells receive some non-lethal leaking irradiation. These second cancers are mainly sarcomas, and may develop with a latency of 3 to 20 years. By means of cell biology experiments, we have determined the distribution of DNA damage (SSBs and DSBs) both within, and at the borders of the irradiation field, following various conditions of irradiation. We also investigated DNA damages and induction of senescence after a simulation of fractionated treatment. Fluorescent detection of 53BP1 and XRCC1 foci was used as a marker of DSBs and SSBs respectively. Finally, the induction of a state of senescence has been tested by measurement of SA-beta-galactosidase activity. In parallel, we developed a theoretical agent-based model of cell evolution under the action of cytotoxic treatments, such as radiotherapy or chemotherapy. The major features of cell cycle and proliferation, cell damage and repair, and chemical diffusion are included. Cell evolution is based on a discrete Markov chain for each cell, and the solution of the model is carried out by a stochastic Monte Carlo solver. Two showcase applications of the model are then presented, namely the reproduction of experimental cell survival curves, and a simplified simulation of the “bystander” effect.

Keywords: radiobiology, radio-induced cancer, DNA damage, senescence, cell population modeling, statistical simulation methods

À mes chers Parents...

À Emmanuelle, ma chance...

Remerciements

Merci à Corinne Abbadie, ma directrice de thèse, pour son encadrement, sa confiance, et son savoir qu'elle sait partager avec tant de passion.

Merci à Fabrizio Cleri, mon directeur de thèse pour ses conseils, ses connaissances et l'aide qu'il m'a apportés tout au long de cette thèse.

Merci à tous les deux d'avoir pris cet engagement d'encadrer une thèse interdisciplinaire, pour la disponibilité et l'ouverture d'esprit dont ils ont fait preuve pour entremêler les disciplines.

Merci à la région, au président de l'université de Lille et aux directeurs des unités UMR8161 et UMR8520 d'avoir rendu possible ce travail de thèse et de m'avoir accueilli dans leur laboratoire.

Merci au Centre Oscar Lambret et à Eric Lartigau pour m'avoir permis d'utiliser un accélérateur LINAC dédié à la radiothérapie pour la réalisation des expériences d'irradiations cellulaires.

Merci aux membres du Jury Eric Lartigau, Janet Hall, Laure Sabatier, Enrico Carlon et Jean-Luc Ravanat.

Merci à Laure Sabatier et Enrico Carlon d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse.

Un grand merci, à l'ensemble des membres de l'équipe ICE, Albin Pourtier, Olivier Pluquet, Nathalie Martin, Fatima Bouali, Joe Nassour, Claire Drullion, Laure Saas, Erwan Goy pour leur sympathie et le professionnalisme dont ils ont su faire preuve au quotidien, ainsi que pour l'aide qu'ils m'ont apportée tout au long de cette thèse.

Un grand merci, à l'ensemble des membres de l'équipe SDYNA pour leur accueil et leur sympathie.

Merci à Joe Nassour et Nathalie Martin, pour leur implication toute particulière, et l'aide qu'ils m'ont prodiguée.

Merci à Thomas Lacornerie et Benoit Vatrinet pour l'assistance qu'ils m'ont apportée dans la mise en place des irradiations cellulaires.

Merci à Antonino Bongiovanni, Gaspard Deloison et Alexandre Vandeputte, pour leur expertise en traitements d'images et en technique à haut-contenu, ainsi que pour le temps qu'ils m'ont accordé.

Merci à mes Parents qui m'ont toujours soutenu et ceci de manière inconditionnelle.

Merci à mes frères et à ma sœur qui ont toujours cru en moi.

Merci à la famille, à la belle-famille

Merci à toi Emmanuelle, de m'avoir accompagné dans ce projet et de me donner tant au quotidien

Enfin Merci à tous ceux que je ne cite pas ici, mais qui ont contribué d'une manière ou d'une autre au bon déroulement de cette aventure.

Table des matières

Résumé	v
Remerciements	vii
Table des matières	xi
Liste des tableaux	xv
Table des figures	xvii
Introduction générale	1
1 Physique des rayonnements ionisants	7
1.1 Propriétés des rayonnements X en radiothérapie	7
1.1.1 Interactions des photons avec la matière vivante	12
1.1.2 Spectre d'énergie des faisceaux de photons X	20
1.2 La dosimétrie en radiothérapie anticancéreuse	25
1.3 Les différents volumes en radiothérapie	29
1.4 Les différents types de radiothérapie conformationnelle 3D (3DCRT)	33
1.4.1 Procédure pour la réalisation d'un traitement par radio- thérapie conformationnelle 3D	34
1.4.2 Les nouveaux types de radiothérapie conformationnelle .	35
2 Rayons X et effets biologiques	39
2.1 Dommages à l'ADN induits par les RX	39
2.1.1 Chimie de l'ADN	39
2.1.2 Les dommages induits à l'ADN par les rayonnements ioni- sants	42
2.2 Signalisation et réparation des CSB et CDB	47
2.2.1 La réparation des cassures double brin de l'ADN	48
2.2.2 La réparation des cassures simples brins de l'ADN	50
2.2.3 Lien entre CSB et CDB	51

2.3	Cassures de l'ADN et cycle cellulaire	53
2.3.1	Le cycle cellulaire	53
2.3.2	Blocage réversible du cycle cellulaire	54
2.3.3	Blocage irréversible du cycle cellulaire	57
2.4	Induction de mort cellulaire par les cassures de l'ADN radio-induites	60
2.4.1	Apoptose	62
2.4.2	Autophagie	64
2.4.3	Nécrose	65
2.4.4	Mort mitotique et mort différée	66
3	Endommagement de l'ADN après irradiation	69
3.1	Seconds cancers radio-induits	69
3.2	Caractéristiques des sarcomes en territoire irradié	70
3.3	hypohèse sur les cancers radio-induits	74
4	Mise au point du système expérimental	79
4.1	Culture de fibroblastes humains normaux	80
4.2	Analyse des foyers XRCC1 et 53BP1	81
4.3	Essais comète pour la recherche de cassure-simple et double-brin	88
4.4	Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux	92
4.5	Analyse de la sénescence par cytométrie en flux	92
4.6	Paramètres d'irradiation	93
4.6.1	Détermination du rendement en profondeur pour le LI-NAC utilisé et les énergies de faisceaux X disponibles . .	96
4.6.2	Placement des boîtes de cellules en bordure du champ . .	96
4.6.3	Validation du dépôt de dose dans le PTV et en bordure .	98
4.6.4	Choix de l'énergie du faisceau d'irradiation : 20 MV versus 6 MV	104
5	Étude des cassures de l'ADN et du devenir cellulaire après irradiation à faibles doses	107
5.1	Quantité de CDB et CSB induites dans le PTV, pour des doses faibles, évaluée par essai comète	107
5.2	Croissance cellulaire durant une radiothérapie simulée	109
5.3	Cycle cellulaire durant une radiothérapie simulée	111
5.4	Sénescence induite par une radiothérapie simulée	113
6	Étude des cassures de l'ADN et du devenir de cellules placées en bordure du champ d'irradiation	117
6.1	Évaluation de la quantité de CSB et CDB en bordure	117
6.1.1	Pour une irradiation de 2Gy	117

6.1.2	Pour une irradiation à différentes doses	118
6.2	Réparation des CSB et CDB en bordure	124
6.3	croissance cellulaire en bordure	126
6.4	Sénescence en bordure induite par une radiothérapie simulée . .	127
6.5	Accumulation des CSB et CDB en bordure	132
7	Conclusion/Discussion de l'étude expérimentale	137
8	Modélisation du devenir cellulaire	147
8.1	Les modèles mathématiques utilisés en radiobiologie	148
8.1.1	Modèle Une cible à Un coup	149
8.1.2	Modèle N cibles à un coup	149
8.1.3	Modèle à deux composantes	150
8.1.4	Modèle linéaire quadratique	150
8.1.5	Modèle Markovien de la réponse cellulaire	151
8.2	Développement d'un modèle du devenir cellulaire	154
9	Modélisation du devenir cellulaire	157
9.1	Description du modèle et de ses paramètres	157
9.1.1	Formalisation du cycle cellulaire normal	158
9.1.2	Formalisation du phénomène de sénescence normale . . .	158
9.1.3	Formalisation de l' endommagement de l'ADN suite à l'exposition à l'agent cytotoxique	159
9.1.4	Formalisation de l' arrêt du cycle cellulaire, de la mortalité cellulaire et de la reprise de prolifération	161
9.1.5	Formalisation de la diffusion	162
9.1.6	Simulation Monte Carlo	164
9.2	Calibration du modèle du devenir cellulaire	168
9.2.1	Calibration de l'induction et de la réparation des CSB et CDB	168
9.2.2	Induction de CDB selon la dose et vérification de la loi de Poisson	171
9.2.3	Effet d'une probabilité de réparation variable selon la phase du cycle cellulaire	173
9.3	Mise à l'épreuve du modèle	173
9.4	Effet de la variation du N_{crit} sur la survie cellulaire	179
9.4.1	Effet de la probabilité de réparation sur la cinétique de réparation des CDB	180
9.4.2	Fraction de mortalité en fonction du N_{crit}	181
9.5	Application du modèle à l'effet bystander	185

10 Conclusion/Discussion sur le modèle	193
Bibliographie	199
11 article publié dans le cadre de la thèse	211

Liste des tableaux

4.1	<i>Protocole culture cellulaire.</i>	81
4.2	<i>Protocole immunofluorescence.</i>	84
4.3	<i>Protocole Essai Comète.</i>	91
4.4	<i>Protocole d'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux.</i>	93
4.5	<i>Protocole de marquage C12FDG.</i>	95
9.1	<i>Liste des principales variables du modèle. Sauf indication contraire, toutes les variables sont sans dimension.</i>	169
9.2	<i>Liste des principales variables du modèle (suite). Sauf indication contraire, toutes les variables sont sans dimension.</i>	170

Table des figures

1	Effet direct et indirect des RI	4
1.1	Énergie de liaison des électrons	9
1.2	Les rayonnements	11
1.5	effet photoélectrique	17
1.6	effet Compton	19
1.7	Prédominance des interactions photon-matière	21
1.8	Spectres de photons modélisés pour un faisceau de 4MV et 6MV	24
1.9	Rendements en profondeur de faisceaux de photons X	28
1.10	Profil de dose des faisceaux de photons X	30
1.11	Volumes Cibles en radiothérapie	32
2.1	La double hélice d'ADN	41
2.2	Les différents niveaux d'enroulement de l'ADN	43
2.4	Mécanisme proposé pour la formation d'une CDB	46
2.5	quantité de dommages à l'ADN	47
2.6	Voie de signalisation des cassures double et simple-brin	52
3.1	Dosimétrie et radiothérapie 3D	71
3.2	Fréquence des cancers radio-induits en fonction de la dose et de la distance du PTV	75
4.1	cellules NHDFs-FIMC en contraste de phase	82
4.2	Exemples de foyers 53BP1 et XRCC1	85
4.3	Méthode d'analyse des foyers 53BP1 et XRCC1	86
4.4	Cinétique de formation des foyers XRCC1 et 53BP1 dans le PTV	89
4.5	exemple de comète	90
4.6	Étude du cycle cellulaire après irradiation	92
4.7	Analyse de la sénescence par marquage C12FDG	94
4.8	Analyse de la taille et de la granularité par cytométrie	94
4.9	Rendement en profondeur pour 6MV et 20 MV	97
4.10	Placement des plaques 96 puits en bordure du champ d'irradiation	100

4.11	Profil de dose pour un champ 10x10 cm ²	101
4.11	Validation du dépôt de dose dans le PTV et en bordure	103
4.12	Quantité de foyers 53BP1 par cellule après une irradiation de 2 Gy à 6MV et 20MV	105
5.1	Quantité de CDB et CSB induites dans le PTV	108
5.2	Croissance cellulaire pendant un traitement radio-thérapeutique simulé	110
5.3	Étude du cycle cellulaire pendant un traitement radio-thérapeutique simulé	112
5.4	Sénescence induite par un traitement radio-thérapeutique simulé	114
6.1	Étude des cassures de l'ADN en bordure après 2 Gy	119
6.1	Étude des cassures de l'ADN en bordure après différentes doses dans le PTV	123
6.2	Étude de la réparation des CDB (panel A) et CSB (panel B) après une irradiation en bordure du champ	125
6.3	Étude de l'influence d'un traitement radiothérapeutique simulé sur la croissance cellulaire en bordure du champ	127
6.3	Étude de l'induction de sénescence par un traitement radiothérapeutique simulé bordure du champ	131
6.3	Étude de l'influence d'un traitement radio thérapeutique simulé sur l'accumulation des foyers 53BP1 et XRCC1 en bordure du champ	135
7.1	Origine de la dose reçue en bordure du champ d'irradiation . . .	139
7.2	Spectres en énergie des photons pour des faisceaux 6 MV et 15 MV	140
8.1	modèle markovien	152
9.0	Diagramme de Flux de la simulation Monte Carlo	167
9.1	Irradiation et évolution après 2 Gy	172
9.2	Simulation de la fraction de CDB/cellule accumulées pour différentes doses	174
9.3	Effet de l'inclusion d'une probabilité de réparation dépendante de la phase du cycle cellulaire	175
9.4	Simulation de la fraction de mortalité cellulaire pour une colonie de N=500 cellules	176
9.5	Simulation des données expérimentales de fraction de survie . .	178
9.6	Réparation des CDB en fonction du temps pour les différentes probabilités de réparation	180
9.7	Variation de la fraction de mortalité en fonction du Nombre critique	182

9.8	variation de la fraction de mortalité en fonction du Nombre critique	183
9.9	Cartes de concentration pour la simulation de l'effet "bystander"	190
9.10	Simulation du taux de duplication de cellules non-irradiées après 24h	191
9.11	Simulation du taux de duplication de cellules non-irradiées après 24h	192
10.1	Evaluation de la saturation du système de réparation des cellules NHDFs-F1MC	195

Introduction générale

Le cancer est de nos jours une des principales causes de décès par maladie dans le monde. En effet l'agence internationale de recherche sur le cancer (CIRC) a estimé que 8.2 millions de décès dans le monde en 2012 étaient dus au cancer. Ils estiment également que le nombre de cas de cancer par an devrait augmenter de 14 millions en 2012 à 22 millions au cours des deux prochaines décennies (STEWART et WILD 2014). On estime par ailleurs que le cancer touche plus les populations dans des pays développés que dans les pays sous-développés (FERLAY et al. 2010; JEMAL et al. 2011; « The Global Burden of Cancer 2013 » 2015; BASKAR et al. 2012). Le cancer est une maladie multigénétique et multicellulaire qui peut se développer à partir de tous les types cellulaires et dans tous les organes. Hanahan et Weinberg ont identifié six caractéristiques principales dans le développement du cancer (HANAHAN et R. A. WEINBERG 2000; HANAHAN et Robert A. WEINBERG 2011), à savoir :

- les cellules cancéreuses ont un potentiel prolifératif considéré comme illimité, avec toutefois une nuance à apporter puisque des travaux récents montrent que les cellules cancéreuses peuvent également entrer dans un processus de sénescence COLLADO et SERRANO 2010
- Les cellules ne répondent plus aux régulateurs de croissance
- Les cellules auto-contrôlent leur prolifération
- Les cellules sont résistantes à la mort, notamment par apoptose
- Les capacités d'angiogénèse sont stimulées
- Les cellules envahissent l'organe, voire même l'organisme entier à travers la formation de métastases

Si la croissance de la tumeur et des métastases n'est pas contrôlée, alors le cancer entraîne la mort du patient (CHAFFER et Robert A. WEINBERG 2011). Les

dernières années ont vu naître des progrès considérables dans la compréhension, la détection et le traitement des cancers, rendant un grand nombre de ceux-ci curables (POLLACK et al. 2009).

La radiothérapie utilise les rayonnements ionisants dans le but d'éradiquer les cellules cancéreuses. Il est communément admis de considérer l'ADN comme la principale cible des rayonnements ionisants en termes de conséquences pour la vie cellulaire. En effet l'ADN joue un rôle primordial dans le fonctionnement de la cellule, il est porteur de l'information génétique apparue, élaborée et conservée tout au long de l'évolution. L'ADN assure sa propre réplication et sa transcription en acide ribonucléique (ARN) qui est le support intermédiaire de l'information conduisant à la synthèse de protéines. La transmission de l'information génétique d'un individu lors de sa reproduction ou d'une cellule lors de sa division se fait à travers la transmission de l'ADN, elle joue donc un rôle unique dans le développement et l'évolution des espèces. Des perturbations chimiques ou physiques peuvent créer des changements dans la structure de l'ADN. Ces changements de structure peuvent conduire à l'impossibilité pour la cellule de se diviser, à la mort cellulaire, ou encore à des mutations de l'ADN qui peuvent être responsables d'une instabilité génétique et de la transformation de cellules saines en cellules malignes donc cancéreuses. Si les dommages à l'ADN sont trop importants et si les mécanismes de réparation sont dépassés ou inefficaces, alors ces dommages provoquent la mort cellulaire. C'est pour leur capacité à induire la mortalité cellulaire que les rayonnements ionisants sont utilisés dans les stratégies curatives des tumeurs par radiothérapie. Les protocoles de radiothérapie sont définis principalement en fonction du type de la tumeur, de sa localisation, de sa taille, du degré d'invasion, et de son grade. La dose totale en Gy ne suffit pas pour définir le traitement par irradiation, il faut prendre en compte la dose par fractions, le nombre total de fractions et le nombre de fractions par jour ou par semaine.

La radiothérapie se divise en deux catégories principales : la radiothérapie externe et la curiethérapie. Dans la radiothérapie externe la source de rayonnement est à une certaine distance du patient et donc du volume à traiter. A l'inverse dans la curiethérapie les sources de rayonnements sont placées directement dans le volume cible ou sur la cible. La plupart des radiothérapies externes sont

réalisées avec des faisceaux de photons, certaines avec des faisceaux d'électrons et une très petite fraction avec des particules telles que les protons, des ions lourds ou des neutrons. Dans l'ensemble de ce travail de thèse, il a été question de se focaliser sur la radiothérapie externe par faisceaux de photons.

La radiothérapie externe moderne utilise une multitude de faisceaux d'irradiation, de taille et d'énergie variables, ceci afin d'obtenir une distribution uniforme de la dose à l'intérieur du volume cible tout en épargnant au maximum les tissus sains autour de la cible.

Les effets biologiques consécutifs à l'exposition aux rayonnements ionisants sont l'aboutissement d'une longue chaîne de phénomènes physiques, chimiques et biologiques déclenchée par le passage du rayonnement ionisant dans les tissus. Les événements initiaux sont d'origine physique et sont du domaine de l'interaction rayonnement-matière, ce sont les ionisations et excitations des ions et molécules le long de la trajectoire des particules ionisantes. Ces ionisations et excitations et les processus physico-chimiques qui en découlent vont se caractériser par un dépôt d'énergie dans la matière et un endommagement de celle-ci. Le dépôt d'énergie dans la matière se produit de façon directe ou indirecte. On parle d'effet direct lorsque le rayonnement ionisant dépose directement son énergie sur la molécule cible. Les effets indirects quant à eux se caractérisent par l'ionisation de molécules d'eau (radiolyse de l'eau) qui sont à l'origine de la création de radicaux libres et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui viennent endommager chimiquement les molécules (voir figure 1). La proportion des dommages créés par effet direct ou indirect dépend du type de rayonnement ionisant. Par exemple dans le cas des Rayons X et Gamma qui sont des rayonnements à faible transfert linéique d'énergie ? on considère que les dommages à l'ADN se font à 40 % par effet direct contre 60 % par effet indirect en moyenne (TUBIANA 2009).

Bien que la radiothérapie permette aujourd'hui de traiter des millions de patients avec des résultats indiscutables en terme de contrôle tumoral et survie des patients, un des effets secondaires les plus sérieux reste la survenue de second cancer en territoire irradié. Ce sujet est de plus en plus important en oncologie clinique, avec un impact sur le traitement des patients et la prise de décision des thérapeutes. L'estimation des risques de développer un second cancer sont issus

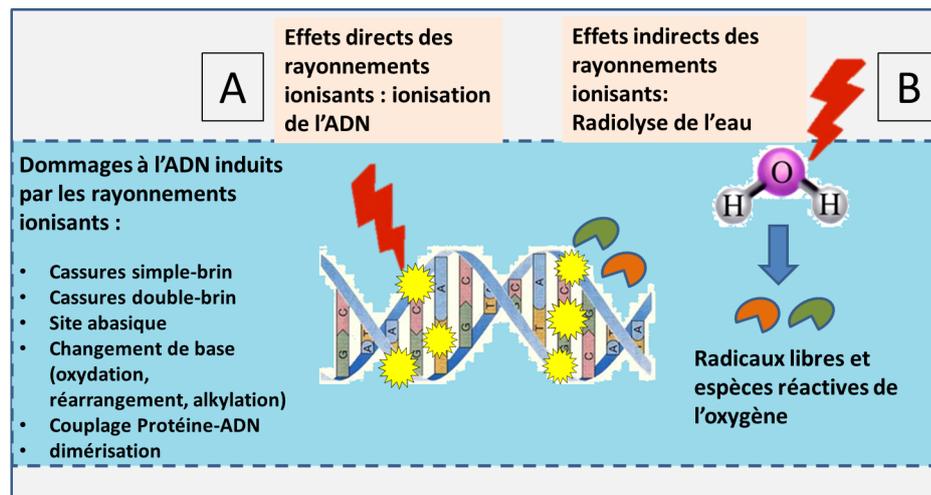


FIGURE 1 – Les rayonnements ionisants agissent sur les biomolécules soit directement (dépôt d'énergie direct sur la molécule) (A), soit indirectement, par l'intermédiaire des radicaux libres ou des espèces actives de l'oxygène provenant de la radiolyse de l'eau (B). Les rayonnement ionisants induisent dans l'ADN une grande variété de lésions : Cassures simple et double-brin, altérations de bases pyrimidiques et puriques, destruction de sucres, sites abasiques, pontages intrabrins (dimérisation) ou interbrins ADN/ADN, pontage ADN-protéines et dommages multiples localisés.

des études épidémiologiques et des modèles prédictifs des décennies précédentes avec de grandes incertitudes. L'ère moderne se caractérise notamment par des technologies de radiothérapie conformationnelle, des approches utilisant des marqueurs moléculaires et génétiques, des études pangénomiques et de stratification des risques, et des modèles prédictifs sophistiqués basés sur les processus de cancérogenèse connus. On compte aujourd'hui quatre facteurs affectant les risques de cancer secondaire qui sont :

- l'âge du patient au moment du traitement par radiothérapie
- les facteurs de risque génétique
- l'organe et le site des tissus qui reçoivent le traitement par radiothérapie
- la dose, le volume de tissu irradié et le type de rayonnement utilisé.

Il est donc essentiel d'améliorer notre compréhension des mécanismes et des causes qui sont à l'origine de ces seconds cancers radio-induits. (NG et SHURYAK 2014)

Dans mon travail de thèse présenté ci après il a été question d'évaluer l'effet des faisceaux de photons X classiquement utilisés en radiothérapie sur des cellules fibroblastiques placées en plein champ et en bordure du champ d'irradiation avec pour objectif de mieux comprendre les mécanismes à la base des cancers radio-induits comme les seconds sarcomes qui se développent préférentiellement en bordure du champ d'irradiation où la dose absorbée est faible par rapport à la dose absorbée en plein champ. Ce travail a comporté un volet expérimental et un volet théorique. Une première partie introduira toutes les notions nécessaires à la compréhension de ce travail de thèse. La deuxième partie portera sur l'étude expérimentale où il a été question d'évaluer l'endommagement de l'ADN, ainsi que le devenir cellulaire en terme de croissance, d'arrêt dans le cycle et de sénescence, consécutivement à une dose d'irradiation ou des doses multiples en plein champ et en bordure. Enfin la dernière partie portera sur la présentation du modèle théorique d'évolution cellulaire développé dans le cadre de ce travail de thèse. Il s'agit d'un modèle mathématique et biophysique permettant de décrire l'évolution d'une population cellulaire (croissance, mortalité, arrêt dans le cycle, sénescence) soumise à un agent génotoxique tel que les radiations ionisantes.

Physique des rayonnements ionisants et radiothérapie externe anti-cancéreuse

Dans cette partie il est question d'exposer certains aspects fondamentaux de la physique des particules et de la physique médicale appliquées à la radiothérapie externe par faisceaux de photons X. Cette introduction reprend des notions bien connus dans ces domaines sans être exhaustif et est construite en partie à partir de ce que l'on trouve dans les ouvrages qui font références dans ces domaines tels que : JOINER et KOGEL 2009, PODGORSAK et AGENCY 2005.

1.1 Propriétés des rayonnements photons X utilisés en radiothérapie externe anti-cancéreuse

Un rayonnement est défini comme le processus par lequel de l'énergie est transmise sous forme de particules, d'ondes électromagnétiques ou encore d'ondes acoustiques. Dans le cas particulier du rayonnement électromagnétique le transport d'énergie s'effectue sans transport de matière (c'est-à-dire sans transport de masse). Les rayonnements électromagnétiques peuvent être définis en invoquant l'aspect ondulatoire à travers des propriétés telles que la

longueur d'onde et la fréquence ou en invoquant leur aspect corpusculaire à travers l'énergie des photons. Le rayonnement particulaire est quant à lui un flux de particules possédant une masse au repos et est donc définie par le type de particule qui transporte l'énergie (quelle soit élémentaire ou non). Ainsi on peut distinguer les particules chargées (électrons, positons, protons) et les particules neutres (essentiellement les neutrons).

Dans le domaine de l'interaction des rayonnements avec la matière biologique on distingue classiquement deux types de rayonnements : les rayonnements ionisants et les rayonnements non ionisants. Les rayonnements ionisants ont une énergie suffisante pour arracher des électrons aux atomes constitutifs de la matière tandis que les rayonnements non ionisants n'ont pas l'énergie suffisante le faire. En effet dans la matière, les électrons appartiennent à des édifices structurés qui sont les atomes, les molécules ou encore les ions. Pour détacher un électron et ainsi provoquer une ionisation, il faut fournir une énergie égale à son énergie de liaison (W). Dans les atomes, les énergies de liaison ont des valeurs dont le tableau 1.1 donne quelques exemples. A l'état fondamental, les électrons occupent les places disponibles dans les orbites les plus fortement liées. L'énergie de liaison des électrons les plus périphériques, qui correspond au premier potentiel d'ionisation, est de l'ordre de 10 eV. Dans les molécules, l'énergie à fournir pour extraire un des électrons les plus périphériques est, comme pour les atomes, de l'ordre de 10 eV. Pour la matière vivante composée principalement d'Hydrogène, de Carbone, d'Azote et d'Oxygène (H,C,N,O) une radiation peut être considérée comme ionisante si son énergie est supérieure à 12.4 eV.

Des énergies un peu plus faibles peuvent produire des états moléculaires excités c'est-à-dire état pour lequel l'électron se trouve sur un niveau d'énergie supérieure mais sans éjection de celui-ci du cortège électronique. Par ailleurs, l'énergie d'ionisation est nettement supérieure à l'énergie de liaison intramoléculaire. Celle-ci est, par exemple de 4.9 eV pour la liaison C=C et de 5.16 eV pour la liaison H-OH. La molécule ionisée présente un excédent d'énergie interne égal à l'énergie de liaison électronique fournie pour provoquer l'ionisation. Cet excédent d'énergie est donc largement suffisant pour entraîner la lyse de la molécule. L'excitation moléculaire peut avoir la même conséquence. Effectivement,

ATOMES					
ATOME	Z	COUCHE			
		K	L	M	N
H	1	13,6	(3,4)	(1,5)	
C	6	284	11,2		
O	8	532	13,6		
P	15	2142	128	10,9	
Ca	20	4038	346	47	6,1

MOLECULES	
H2	15,6
O2	12,5
H2O	12,6
NO2	11
CO2	14,4

FIGURE 1.1 – Énergie de liaison des électrons d'après TUBIANA, DUTREIX et WAMBERSIE 1986. Les valeurs soulignées représentent l'énergie de liaison de l'électron le plus faiblement lié (premier potentiel d'ionisation. Pour les molécules il s'agit également des électrons les plus périphériques (premier potentiel d'ionisation moléculaire). Des énergies plus faible peuvent produire des états excités.

certaines radiolésions dans l'ADN peuvent être induites par des électrons de faible énergie (<10 eV) qui peuvent parfois produire une cassure double-brin (BOUDAÏFFA et al. 2000).

Les rayonnements ionisants regroupent les rayonnements particuliers ainsi que la partie du spectre électromagnétique où les photons ont une longueur d'onde $\lambda < 100$ nm (Rayons X et Rayons γ) tandis que les rayonnements non ionisants regroupent la partie du spectre électromagnétique où les photons ont une longueur d'onde $\lambda > 100$ nm (Radioélectriques, Micro-ondes, Infrarouges, Visible, Ultraviolet)(voir figure 1.2). Les rayonnements ionisants ont deux modalités principales d'interactions avec la matière en fonction de leur nature, en effet ils sont soit directement ionisant soit indirectement ionisant. Dans le cas des rayonnements directement ionisant tels que les particules chargées (électrons, protons, ions lourds) il y a ionisation et excitation des électrons du milieu directement par collisions des particules entre elles, ou encore par effet électrostatique. Pour le cas des rayonnements indirectement ionisants tel que les rayonnements de photons X les ionisations sont générées par la mise en mouvement des électrons constitutifs du milieu traversé (électrons secondaires).

Ainsi dans le cas des faisceaux de photons de haute énergie classiquement utilisé en radiothérapie, le dépôt d'énergie dans la cellule se fait suivant deux étapes principales que l'on regroupe sous le terme de cascade électronique :

- 1- Les photons incidents interagissent avec les atomes qui constituent la matière vivante entraînant l'éjection d'un ou plusieurs électrons du cortège électronique de ces atomes dans le milieu. Autrement dit, les rayonnements photons vont ioniser la matière et donc expulser des électrons. Ces électrons sont appelés électrons secondaires.
- 2- Ces électrons secondaires vont à leur tour interagir avec les atomes du milieu et déposer leur énergie via des processus d'ionisation et d'excitation, on parle alors de cascade électronique. Si l'énergie transférée par l'électron incident est supérieure à l'énergie de liaison d'un électron de l'atome cible, celui-ci est expulsé du cortège et il y a ionisation de l'atome. Si l'énergie transférée par l'électron incident est exactement égale à la différence entre les énergies de liaison de 2 couches électroniques de l'atome cible, un électron de cet atome saute sur une couche moins liée et

Rayonnement				
ionisant			Non ionisant	
particules			électromagnétiques	électromagnétiques
Non chargées	chargées		$\lambda < 100 \text{ nm}$	$\lambda > 100 \text{ nm}$
neutrons	Légères • Électrons • Positons	Lourdes • Alpha • Protons • deutons	• Rayons X • Rayons γ	• Radioélectriques • micro-ondes • Infrarouges • Visible • Ultraviolet

FIGURE 1.2 – *Présentation des principaux types de rayonnement.*

il y a excitation.

Équilibre électronique

Nous allons présenter ci-après les principales interactions rayonnement-matière utiles à la compréhension d'un traitement du cancer par radiothérapie de photons X qui utilise comme source primaire un accélérateur linéaire d'électrons (LINAC). Les rayonnements viennent interagir avec la matière biologique en cédant tout ou partie de leur énergie aux molécules constitutives de cette matière. L'interaction rayonnement-matière dépend du type de rayonnement (particulaire ou électromagnétique) et de son énergie, donc encore une fois de son pouvoir d'ionisation qui correspond à sa capacité à éjecter un électron de la molécule irradiée.

Ainsi dans le cadre d'un traitement de radiothérapie qui utilise des photons X, pour caractériser le dépôt d'énergie dans la matière vivante nous devons distinguer les particules non chargées telles que les photons, des particules chargées telles que les électrons (d'ionisation et secondaires)

Pour contrôler la dose absorbée (voir section 1.2) qui est responsable des effets biologiques dans les cellules irradiées, dans le cadre du projet expérimental de ce travail de thèse, nous nous sommes toujours placés dans les conditions de l'équilibre électronique. En effet c'est à la condition de l'équilibre électronique que la dose absorbée peut être parfaitement maîtrisée. L'équilibre électronique

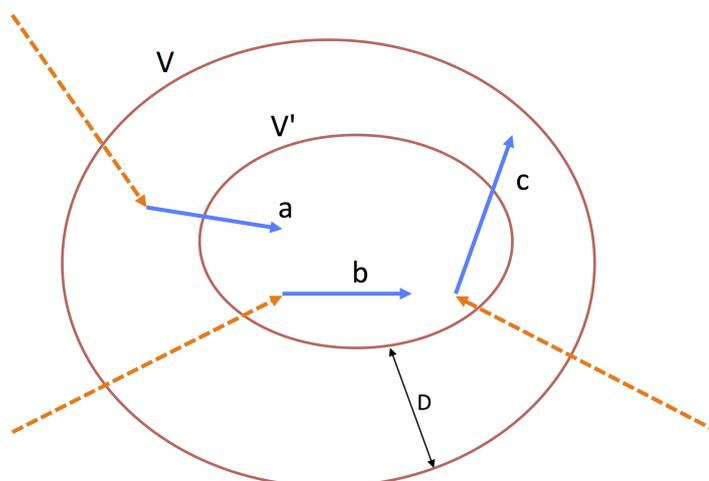


FIGURE 1.3 – Description schématique du concept d'équilibre électronique : on considère la région V' à l'intérieur d'un volume irradié V . Si la distance D de cette région de la surface est inférieure au libre parcours moyen des électrons pour l'énergie considérée, on peut définir la condition d'équilibre électronique. Dans cette région, les photons (orange en tirets) peuvent donner lieu à trois types de trajectoires d'électrons (bleu) : trajectoire a , qui commence en V et les électrons déposent une partie de leur énergie en V' ; trajectoire b et les électrons déposent toute leur énergie en V' ; et trajectoire c qui commence en V' et les électrons déposent une partie de leur énergie en V . A la condition d'équilibre électronique la somme des énergies déposées dans le volume V' est constante.

qui est une conséquence de la cascade électronique induite par les rayonnements de photons X est atteint quand le flux d'électrons est proportionnel au flux de photons entrant dans le volume considéré (voir figure 1.3). Cette condition est réalisée quand il y a une compensation entre l'énergie transférée dans le volume et absorbée en dehors avec l'énergie transférée en dehors du volume mais absorbée en dedans.

1.1.1 Interactions des photons avec la matière vivante

Les rayonnements de photons X utilisés en radiothérapie anticancéreuse sont des rayonnements électromagnétiques et les photons ne possèdent ni masse, ni charge et ont une vitesse constante toujours égale à la vitesse de la lumière c . Parce qu'il sont électriquement neutres, les photons ne perdent pas dans les

matériaux leur énergie de façon constante par l'intermédiaire d'interactions coulombiennes avec les électrons atomiques, comme le font les particules chargées. Ainsi les flux de photons ont un pouvoir hautement pénétrant dans la matière vivante en comparaison au flux de particules chargées, et c'est la raison pour laquelle on les utilise en radiothérapie externe. En fait, les photons interagissent avec la matière de manière aléatoire et après avoir parcouru parfois une grande distance. Dans l'intervalle typiques des énergies (1-10 keV à 20 MeV) utilisées pour la radiothérapie, Les photons X utilisés vont céder leur énergie par différents processus qui sont :

- l'effet photoélectrique
- la diffusion Compton
- La production de Paires

Dans tous les cas, les photons viennent interagir avec les électrons des atomes constitutifs de la matière vivante. Ces interactions vont mettre en mouvement les électrons de la matière traversée et ces derniers seront responsables du dépôt d'énergie : on les appelle les électrons secondaires. Pour les faisceaux de très haute énergie, il peut également y avoir création de paires d'électrons-positons qui résulte de l'interaction d'un photon avec le noyau d'un atome de la matière traversée.

Pour rendre compte de l'ensemble de ces interactions matière vivante-photons, on fait l'hypothèse que l'atténuation dN du faisceau après avoir traversée une épaisseur dx de matière est proportionnelle à l'intensité du faisceau à cet endroit $N(x)$ multiplié par une probabilité d'interaction. Cette dernière s'exprime soit comme une section efficace, soit comme un facteur d'atténuation celui-ci étant plus pratique pour décrire les interactions des photons :

$$dN = -N\mu dx \quad (1.1)$$

Le signe moins indique qu'il s'agit d'une atténuation. L'intégrale de cette équation donne la relation suivante :

$$N(x) = N_0 \cdot \exp(-\mu \cdot x) \quad (1.2)$$

Cette équation décrit donc la relation entre la quantité de photons initiale N_0 arrivant sur la cible (tissu ou détecteur par exemple) et la quantité de photons à un endroit donné de la cible (épaisseur).

La dépendance en énergie de ce coefficient μ (qui exprime une somme de tous les phénomènes possibles d'interactions dans la matière) est complexe (voir figure 1.4). De manière générale, il diminue avec l'augmentation de l'énergie jusqu'à environ 1 MeV d'énergie incidente, pour ensuite augmenter à cause du phénomène de production de paires. Pour les tissus contenant des éléments lourds (voir par ex. figure 1.4b) l'effet photoélectrique porte des pics caractéristiques aux faibles énergies.

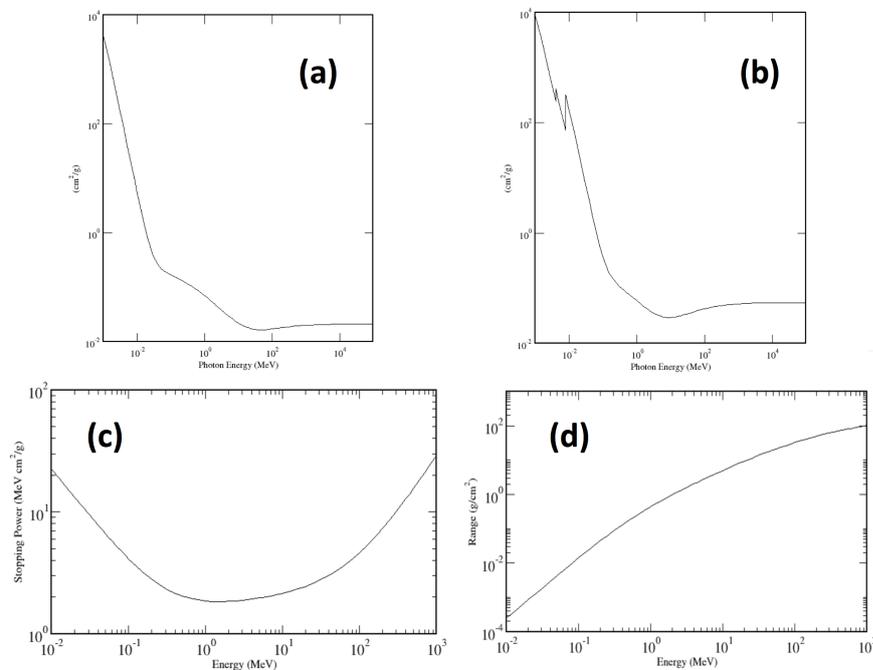


FIGURE 1.4 – (a) : Coefficient d'atténuation μ (cm²/g) en fonction de l'énergie des photons (MeV) traversant un milieu ressemblant au tissu mou (eau) ; à multiplier par la densité $\rho \simeq 1.05$ pour obtenir l'atténuation en cm⁻¹. (b) : Coefficient μ pour des photons traversant un milieu type os dense ; noter les pics photoélectriques aux plus petites énergies. (c) Pouvoir d'arrêt (équivalent au TEL, en MeV-cm²/g) pour des électrons traversant du tissu mou. (d) Parcours libre des électrons dans le tissu mou (g/cm²).

Les interactions des photons engendrent, comme dit plus haut, la mise en mouvement d'électrons secondaires. La perte d'énergie des électrons est caractérisée par le pouvoir d'arrêt, dE/dx , une mesure de la perte d'énergie en fonction de l'épaisseur traversée. La forme typique du pouvoir d'arrêt est donnée en figure 1.4c. Cette courbe a un minimum à une valeur caractéristique d'énergie, en fonction du milieu traversé. Pour le tissu mou (assimilable à de l'eau) cette énergie est de l'ordre de $E \simeq 1$ MeV. En lisant la courbe 1.4c de droite vers gauche, on peut voir que au fur et à mesure que les électrons diminuent d'énergie (E décroissant) leur pouvoir d'arrêt augmente : c'est à dire que l'électron dépose la plupart de l'énergie dans la partie terminale de sa trajectoire. Cette propriété est à la base du concept de "buildup" de la dose (voir section 1.2). Les photons pénétrant un volume de matière, commencent à interagir depuis la surface cependant, les électrons secondaires vont parcourir une certaine distance avant d'atteindre leur maximum de dépôt d'énergie. De ce fait, le dépôt d'énergie dans la matière pour un faisceau de photons ne suit pas simplement la courbe exponentielle donnée par l'Eq. 1.2, mais il y a une accumulation du dépôt d'énergie à une profondeur qui est d'autant plus importante que l'énergie du faisceau de photons primaire est élevé. C'est-à-dire qu'il y a un maximum d'énergie déposé, avant d'observer la décroissance exponentielle et ce maximum d'énergie est d'autant plus en profondeur que l'énergie du faisceau est élevé (voir plus avant, figure 1.9).

Le parcours moyen des électrons secondaires est représenté en figure 1.4d pour un tissu mou équivalent à de l'eau. On peut voir que aux énergies cinétiques inférieures à environ 1 MeV, la relation est approximativement linéaire en échelle log-log. En fait, on peut déduire de simples considérations analytiques que le parcours est proportionnelle au carré de l'énergie, soit $R \propto E^2$.

Ainsi en radiothérapie plus l'énergie du faisceau de photons X est élevée et plus celui ci sera "pénétrant". D'ailleurs, il est classique en radiothérapie par faisceaux de photons X (radiothérapie RX) d'utiliser des faisceaux de photons d'énergie différentes afin d'obtenir l'équilibre voulu entre dose dans le volume cible et dose en dehors du volume cible (tissus sains et organes à risques). En radiothérapie RX de haute énergie il est question de faisceaux Méga-Volt (MV). Ces faisceaux sont produits par des accélérateurs linéaires d'électrons ("LINAC")

fonctionnant avec des tensions supérieures à 1000 kV (1 MV). La tension dans ce cas se réfère à la tension utilisée pour accélérer les électrons qui vont interagir avec la cible du LINAC et produire les faisceaux de photons. La tension utilisée est corrélée avec l'énergie maximum des photons disponibles en sortie de la tête de l'accélérateur.

Effet photoélectrique

L'effet photoélectrique est le processus par lequel un photon transfère intégralement son énergie $h\nu$ à un électron de l'atome traversé, avec pour conséquence l'éjection de celui-ci de son orbitale atomique. Cet électron alors appelé photo-électron pourra lui-même interagir avec les atomes environnant, il perd alors son énergie par phénomène d'ionisation du milieu. La structure en couche des atomes joue ici un rôle primordial. Le photon n'arrache un électron que si son énergie E est supérieure à l'énergie de liaison de l'électron W_{nlm} dans son orbitale atomique avec nombres quantiques (nlm) . L'atome qui a perdu son électron est alors dans un état excité et il s'en suit une réorganisation du cortège électronique pour combler la lacune sur la couche dont a été expulsé l'électron (voir figure 1.5). Lors de cette réorganisation un électron d'une couche de plus haute énergie vient remplir la place vacante, causant un dégagement d'énergie. Cette énergie peut selon les cas causer l'émission d'un photon ou encore être transmise à un électron atomique de plus basse énergie qui sera lui-même éjecté de l'atome. On appelle ce dernier phénomène l'émission d'électron Auger. Ces différents processus sont résumés dans la figure 1.5.

La section efficace (probabilité d'interaction) photoélectrique montre une variation avec le Z du milieu et l'énergie E du photon incident de type :

$$\sigma_{ph} \propto \frac{Z^p}{E^3} \quad (1.3)$$

avec l'exposant p compris entre 4 et 5. On voit donc que l'effet photoélectrique est prépondérant pour des matériaux à Z élevé, ces derniers étant dans les tissus biologiques principalement le Calcium des tissus osseux (ce grand pouvoir d'absorption est exploité dans les images radio-graphiques), et diminue très rapidement avec l'augmentation de l'énergie des photons.

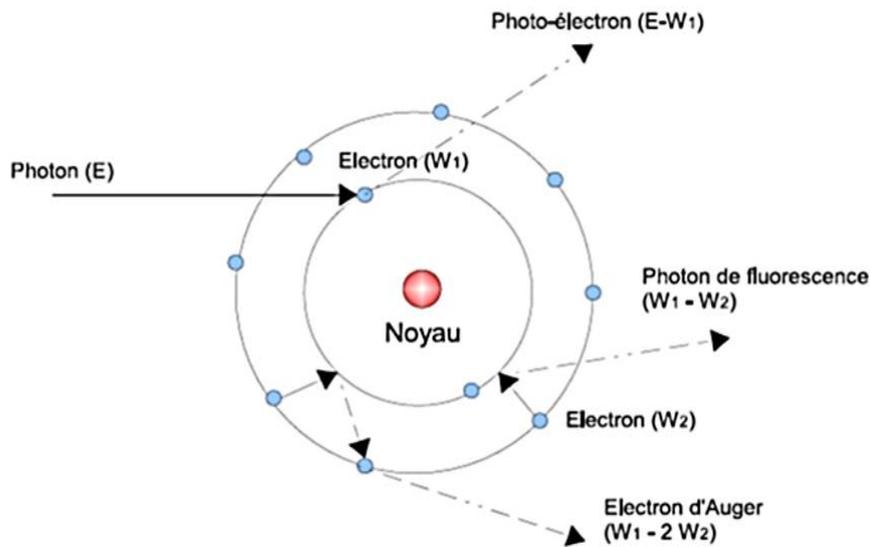


FIGURE 1.5 – Effet photoélectrique : un photon incident d'énergie E éjecte un électron avec une énergie cinétique $E_c = E - W_{nlm}$ (W_{nlm} étant l'énergie de liaison de l'électron projeté). L'orbite vacante est occupée par un électron provenant d'une couche plus externe. Le saut de l'électron libère une énergie, émise sous forme de photon. BADEL 2009

Les pics en "dents de scie" que l'on peut voir en figure 1.4b sont dus au fait que pour des éléments avec un Z assez grand, l'énergie de liaison des couches électroniques plus externes (avec nombre quantique $n > 1$) peut être comparable à l'énergie du photon. Par exemple, pour le Calcium $W_{100} = 4,038$ keV et $W_{200} = 0,438$ keV, des photons avec E comprise entre ces deux énergies de liaison, $W_{200} < E < W_{100}$ peuvent expulser du cortège un électron avec $n=2$ mais pas un électron avec $n=1$. En correspondance de chaque énergie-seuil W_{nlm} on observe donc une chute abrupte de la section efficace σ_{ph} et du coefficient $\mu = \sigma_{ph}\rho_N$ correspondant (la densité ρ_N étant le nombre d'atomes du milieu par unité de volume).

Effet Compton

L'effet Compton est le processus physique par lequel un photon transfère une partie de son énergie $h\nu$ à un électron de l'atome traversé, avec pour conséquence la mise en mouvement de l'électron. De cet effet résulte donc un électron diffusé et un photon diffusé qui pourront à leur tour intervenir dans des processus d'interactions avec la matière.

Il vaut bien de souligner que ceci est un effet apparemment de diffusion inélastique classique, mais il est d'origine purement quantique : le photon ayant une masse nulle, il ne devrait pas donner origine à une cinématique de type diffusion. Cela est seulement en introduisant l'hypothèse d'un comportement de "particule" associé à l'onde électromagnétique. Ainsi on peut obtenir une équation pour la variation d'énergie et impulsion de l'électron suite à la "collision" avec le photon. En prenant $E = cp$ et $E' = cp'$ l'énergie du photon avant et après la collision, \mathbf{p} et \mathbf{p}' son impulsion, \mathbf{p}_e l'impulsion de l'électron sortant (initialement pris à repos), et θ l'angle entre les vecteurs \mathbf{p}' et \mathbf{p}_e , on peut écrire la conservation de l'énergie et de l'impulsion respectivement comme :

$$p_e^2 = \frac{1}{c^2} (E^2 + m_e c^2 - E'^2) = \frac{1}{c^2} (E^2 + E'^2 + 2(E - E')m_e c^2 - 2EE') \quad (1.4)$$

$$p_e^2 = (\mathbf{p} - \mathbf{p}')^2 = p^2 + p'^2 - 2pp' \cos \theta = \frac{1}{c^2} (E^2 + E'^2 - 2EE' \cos \theta) \quad (1.5)$$

d'où la fameuse formule de Compton, décrivant la relation entre variation de l'énergie du photon et son angle de diffusion :

$$\frac{1}{E'} - \frac{1}{E} = \frac{1}{m_e c^2} (1 - \cos \theta) \quad (1.6)$$

La section efficace totale pour la diffusion Compton d'un électron atomique peut être calculée de manière analytique au moyen des équations de l'électrodynamique quantique, et prend le nom de section de Klein-Nishina. Elle décroît lentement jusqu'à des énergies de quelques MeV, et ensuite montre une décroissance rapide, proportionnelle à $1/E$, pour des énergies croissantes. Étant donné que l'on considère les électrons atomiques indépendants, vis-à-vis de leur

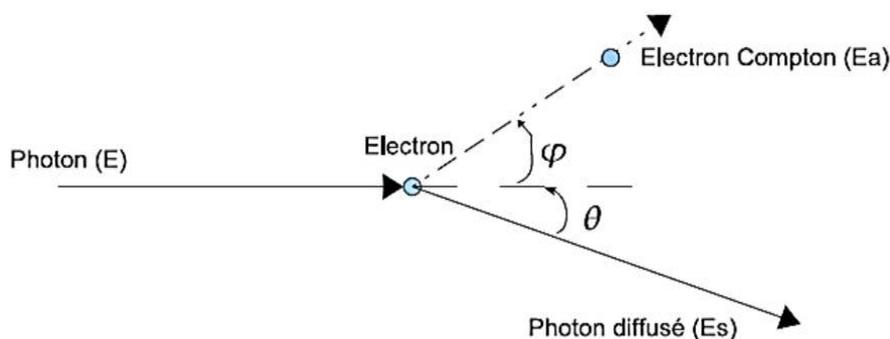


FIGURE 1.6 – L'effet Compton concerne la plupart des électrons atomiques. Un photon qui joue le rôle de projectile entre en collision avec un électron d'un atome qui lui sert de cible. Lors de la collision, l'électron est mis en mouvement selon un certain angle, alors que le photon diffusé selon un autre angle perd de son énergie. BADEL 2009

interaction avec le photons incident, on peut obtenir la section efficace de l'atome simplement en multipliant la section de Klein-Nishina par le numéro atomique Z . Donc, la section efficace pour effet Compton est proportionnelle à Z .

Aux énergies typiques des applications médicales, le photon diffusé émerge généralement dans une direction moyenne selon un angle de 30 à 45° (voir fig. 1.6). Des photons X de plusieurs MeV comme ceux utilisés en radiothérapie par photons X peuvent subir de multiples diffusions Compton avant d'être finalement absorbés par effet photoélectrique.

Création de paires

Enfin dans le cas de la radiothérapie photons X il existe aux énergies utilisées un mode d'interaction des photons avec le noyau qui est la création d'une paire de particules, un électron et son antiparticule, un positon. Cette production ne s'observe qu'au dessus d'une énergie seuil de $1,022$ MeV, énergie requise par la relation d'Einstein $E \geq 2m_e c^2$ pour créer la masse d'un électron et d'un positon (les deux particules ayant une masse a repos identique, $m_e c^2 = 0,511$ MeV). L'excédent d'énergie se répartit, sous forme d'énergie cinétique, entre les

deux particules. Jusqu'à des énergies du photon de 10-20 MeV la section efficace de production de paires est proportionnelle à l'énergie multipliée par le carré du numéro atomique de l'atome :

$$\sigma_{pp} \propto Z^2 E \quad (1.7)$$

Après que le positon a traversé une épaisseur de matière presque égale à celle traversée par l'électron d'énergie équivalente, ce processus est suivi d'une annihilation dans laquelle le positon et un électron du milieu s'annihilent mutuellement, en générant un paire de photons de 511 keV (le total de leur énergies étant égal à la somme de la masse du positon et de l'électron annihilés) émis à 180° l'un de l'autre.

Prédominance des interactions rayonnement-matière en fonction de l'énergie en radiothérapie

Comme nous l'avons vu dans les équations précédentes, la probabilité pour qu'un photon subisse une quelconque interaction avec la matière dépend à la fois de l'énergie du photon $E = h\nu$ et également du numéro atomique Z du matériau atténuant. En général c'est l'effet photoélectrique qui prédomine pour les photons de faible énergie, alors que c'est l'effet Compton pour les photons d'énergie intermédiaire et enfin la production de paires pour les photons de haute énergie. La figure 1.7 montre les différentes régions de prédominance en fonction de l'énergie du photon et du numéro atomique des atomes de la matière traversée.

En radiothérapie avec un accélérateur LINAC, l'énergie des photons étant autour de 10 MeV, et le matériau étant le tissu avec un Z autour de 7.5, c'est l'effet Compton qui prédomine. Il peut y avoir en moindre proportion un effet de création de paires.

1.1.2 Spectre d'énergie des faisceaux de photons X

Le spectre des faisceaux de photons X émis en sortie du LINAC est la superposition d'un spectre de raies et d'un spectre continu. Le faisceau d'électrons

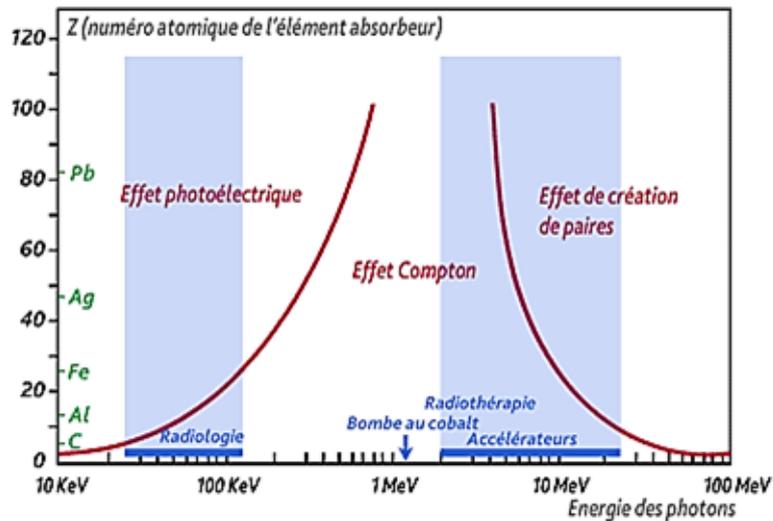


FIGURE 1.7 – Prédominance des interactions photon-matière en fonction du numéro atomique de la cible et en fonction de l'énergie des photons incidents. En radiologie on observe une prédominance de l'effet photoélectrique et en radiothérapie une prédominance de l'effet Compton.

énergétiques sortant de l'accélérateur étant envoyé contre une cible métallique avec un grand Z (en fait, un feuillet de quelques micromètres d'épaisseur), les électrons vont pour la plupart interagir avec les noyaux et les électrons du métal. Le spectre de raies (pics) est dû à l'émission de photons d'énergie caractéristiques qui dépendent de la cible. Le spectre continu est dû au freinage des électrons par les noyaux de la cible (rayonnement de freinage, ou *bremsstrahlung*).

En fait, le pouvoir d'arrêt des électrons peut être approximé comme la somme de deux contributions, l'une étant la partie de collision donnant origine à une avalanche d'électrons secondaires, excitations d'électrons atomiques (qui restent liés à l'atome), et de photons X, et l'autre étant la partie de radiation, due au freinage de l'électron dans le champ électrique du noyau et, en mesure réduite, des autres électrons atomiques :

$$\left(\frac{dE}{dx}\right) = \left(\frac{dE}{dx}\right)_{coll} + \left(\frac{dE}{dx}\right)_{rad} \simeq \left[1 + \frac{E(Z + 1.2)}{800}\right] \left(\frac{dE}{dx}\right)_{coll} \quad (1.8)$$

le second terme entre [...] étant la contribution de radiation, qui varie avec le

produit de l'énergie fois le numéro atomique Z .

La puissance P_{irr} irradiée par une charge e décelérée par un champ électrique d'intensité Ze peut être calculée des équation de l'électrodynamique. Cependant en forme relativiste, on obtient une expression du type :

$$P_{irr} \propto \frac{Ze^2}{(m_e c^2)^q} \quad (1.9)$$

avec un exposant q qui varie entre 4 et 6, pour une accélération dans la direction transversale ou parallèle a la vitesse de l'électron. La section efficace angulaire des photons émis par *bremsstrahlung* est fortement piquée vers l'avant (angles $\theta \leq 5 - 10^\circ$) déjà pour des énergies de l'électron incident de quelques 100 keV, donc l'émission des photons du LINAC est très bien focalisée vers la direction parallèle a celle du faisceau d'électrons primaires.

L'explication qualitative du phénomène de raies est que lorsqu'un électron très énergétique arrive sur un atome de la cible, la probabilité pour qu'il heurte un électron du cortège électronique n'est pas négligeable. Si cet électron possède une énergie cinétique supérieur à l'énergie de ionisation de l'électron du cortège électronique de l'atome cible, celui-ci est expulsé. Si l'électron incident à une énergie cinétique assez forte, il pourra expulser un électrons des niveaux internes de l'atome. Dès lors l'atome devient instable et un réarrangement électronique se produit par émission de photons. Les niveaux de départ et d'arrivée étant parfaitement définis (mécanique quantique), il en résulte que les rayonnements émis seront caractéristiques de l'atome cible. On parle de raies caractéristiques.

L'utilisation du spectre de raie est du ressort de la cristallographie et de l'analyse chimique par fluorescence X. C'est le spectre continu qui à toute son importance dans le domaine de la radiothérapie et de la radiologie en général.

L'explication qualitative du phénomène de spectre continu est que lorsqu'un électron d'énergie cinétique E_c arrive au voisinage d'un noyau de la cible du LINAC, sa trajectoire est déviée et il subit une accélération due à la force répulsive d'origine électrostatique. Les lois de l'électromagnétisme appliquées à une particule chargée accélérée montrent que celle-ci rayonne de l'énergie. L'énergie $E = h\nu$ émise sous forme de rayons X est prélevée sur l'énergie cinétique E_c de l'électron qui poursuit sa trajectoire avec une énergie cinétique plus faible

$E_c' = E_c - h\nu$. L'énergie cinétique des électrons diminue : le rayonnement de photons X est appelé rayonnement de freinage. L'interaction entre le noyau et l'électron est d'autant plus forte que celui-ci passe près de la cible. Toutes les distances entre le noyau et la trajectoire de l'électron incident étant possibles, toutes les valeurs $h\nu$ seront possibles depuis 0 lorsque l'électron passe loin du noyau jusqu'à $E_c(max)$ quand toute l'énergie cinétique de l'électron est communiquée au photon X. cela explique pourquoi l'on obtient un spectre continu. La valeur $E_c(max)$ est liée à l'énergie cinétique des électrons.

Dans le cas spécifique de la radiothérapie, si on considère le faisceau d'électrons comme étant homocinétique, $E_c(max)$ ne dépend que de la tension accélératrice U du LINAC et $E_c = eU$ donc $E_c(max) = eU$. En pratique, la cible est les parois du tube absorbent une grande partie du rayonnement de freinage dans les basses énergies, le spectre "réel" diffère donc du spectre théorique pour les faibles valeurs de μ .

La figure 1.8 montre le spectre continu obtenu après simulation pour deux énergies de faisceaux de photons X, à savoir 4 MV et 6 MV. Dans ces études il a été question de simuler les spectres de photons quittant chacun des éléments de la tête d'un accélérateur : cible, collimateur primaire, cône égalisateur et collimateur secondaire.

D'abord, nous pouvons observer ici que le rayonnement photon utilisé pour traiter les patients est composé de photons ayant des énergies différentes avec une valeur moyenne autour de 1 MeV pour les deux voltages (4MV et 6MV). Par conséquent le dépôt d'énergie se fera dans le patient à des profondeurs différentes et de fait ne permet pas de contrôler de manière optimale la dose déposée dans les tissus sains. Cette dose sera en partie responsable des effets secondaires des traitements par radiothérapie. Il existe donc un intérêt à se poser la question de l'importance de la forme du spectre et de son éventuelle variation en fonction de l'endroit dans la tête de l'accélérateur mais aussi pourquoi pas en fonction de la zone d'irradiation sur le patient (PTV et bordure du champ).

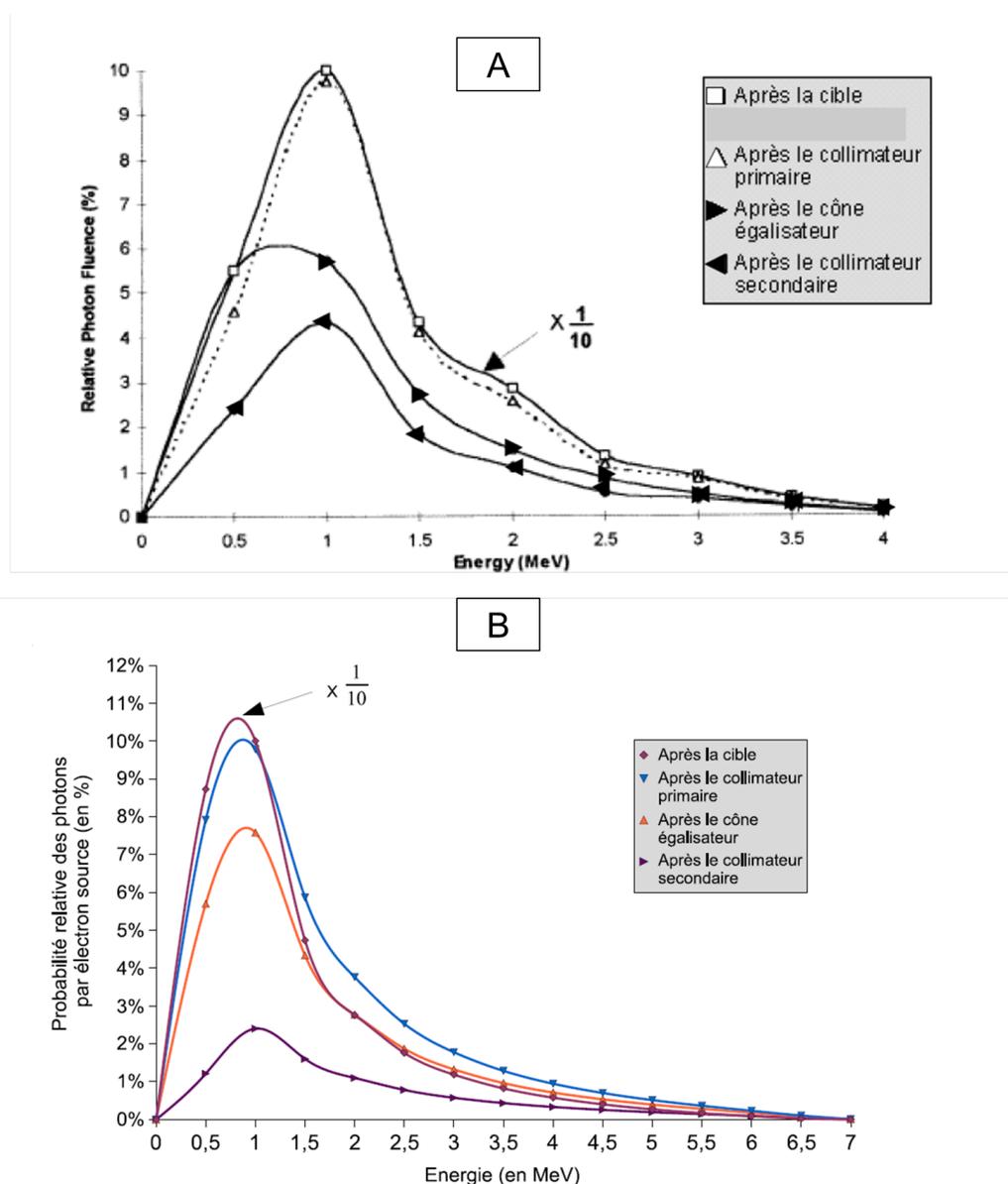


FIGURE 1.8 – Spectres de photons quittant chacun des éléments modélisés de la tête d'un accélérateur de particules pour un faisceau de 4 MV et 6 MV : cible, collimateur primaire, cône égalisateur et collimateur secondaire. Les spectres sont normalisés par rapport aux photons d'énergie 1 MeV quittant la cible.

— A : Modélisation d'un faisceau de photon de 4 MV d'après LEWIS et al. 1999.

— B : Modélisation d'un faisceau de photons de 6 MV d'après BADEL 2009.

1.2 La dosimétrie en radiothérapie anticancéreuse

La dosimétrie quantifie le dépôt d'énergie dans la matière. Dans cette partie il sera question d'exposer les principales définitions pour comprendre la notion de dose en radiothérapie. Le but de la dosimétrie est de pouvoir quantifier la dose reçue par le patient, en effet c'est elle qui conditionne les effets biologiques c'est donc primordial. Pour cela on doit faire la distinction entre :

- L'énergie émise par la source et transportée par le faisceau
- L'énergie reçue et transférée au milieu par interactions
- L'énergie absorbée par le milieu qui est véritablement responsable des effets biologiques.

Énergie totale émise par la source

Pour une source monochromatique, elle s'exprime comme

$$E_{totale} = \int_0^t \varphi(t) dt \quad (1.10)$$

avec $\varphi(t)$ le flux énergétique totale émis par la source en Watts (W). Pour une source avec un spectre d'énergie $n(E)$, il faudra aussi intégrer sur tout l'intervalle d'énergie considéré.

Transfert linéique d'énergie

Toute l'énergie des photons du faisceau primaire se retrouve dans la matière sous forme d'énergie d'ionisation et d'excitation des électrons secondaires. Donc pour définir la quantité d'énergie déposée dans un volume de matière il faut prendre en compte l'ensemble de l'énergie déposée par ces électrons secondaires. Cela est résumé dans le concept de **transfert d'énergie linéique** (logiquement symétrique du pouvoir d'arrêt (dE/dx), celui-ci étant l'énergie perdue par l'électron, et le TEL la même énergie transférée au matériau). C'est le transfert d'énergie linéique (TEL) qui définit le dépôt d'énergie par collision des particules incidentes avec les électrons des atomes du milieu. Ainsi il représente la capacité des particules incidentes à ioniser les atomes du milieu traversé sur une distance

donnée. On définit le TEL restreint et le TEL non-restreint. Le TEL restreint prend en compte seulement l'énergie déposée au voisinage des trajectoires, alors que le TEL non-restreint prend en compte l'ensemble de l'énergie déposée. Ainsi on définit le transfert linéaire d'énergie linéique L_{Δ} comme le quotient dE_{Δ}/dl , dans lequel dE_{Δ} est l'énergie perdue par une particule chargée due aux collisions électroniques en parcourant une distance dl de ce matériau, moins la somme des énergies cinétiques de tous les électrons mis en mouvement pour lesquels les énergies cinétiques sont supérieures à Δ . On a donc au final :

$$L_{\Delta} = dE_{\Delta}/dl \quad (1.11)$$

On définit comme déposée au voisinage des trajectoires l'énergie mise en jeu dans des transferts d'énergie inférieures à une valeur Δ , les transferts d'énergie supérieures à Δ entraînant des électrons d'énergie supérieure à Δ . Il est donc important de spécifier le seuil d'énergie Δ . Le Tel non restreint prend en compte l'ensemble des électrons secondaires mis en mouvement et non pas seulement les électrons secondaires d'énergie inférieure à Δ . L'équation s'écrit alors :

$$L_{\infty} = dE_{\infty}/dl \quad (1.12)$$

Énergie reçue et transférée par le milieu

L'énergie transférée au milieu d'intérêt par l'ensemble des interactions est définie par le KERMA (Kinetic Energy Released in Material). Il correspond aux transferts d'énergie qui se produisent au sein du milieu matériel de masse dm , quel que soit le devenir des particules mises en mouvement lors de ces transferts. Autrement dit, les électrons secondaires générés dans le milieu dm vont se déplacer sans pour autant interagir dans le milieu de masse dm qui nous intéresse pour la dosimétrie.

$$K = \frac{dE_{tr}}{dm} \quad (1.13)$$

Avec K en Joule par kg ou Gray et avec $dE_{tr} = dE_{initial} - dE_{final}$ l'énergie transférée au milieu.

Notons que le Kerma surestime généralement la dose déposée puisqu'il prend

en compte l'ensemble des interactions qui vont ou non déposer réellement leur énergie dans le volume considéré.

Le Gray représente une énergie par unité de masse, 1 Gy correspond à une énergie de 1 Joule déposée dans 1 kg de matière. Cette unité est fondamentale en radiothérapie, en effet c'est elle qui est utilisée pour définir la prescription médicale.

Énergie absorbée par le milieu

C'est l'énergie réellement absorbée par le volume cible qui est responsable des effets biologiques des rayonnements ionisants, elle correspond à la somme des énergies élémentaires qui se déposent dans le milieu considéré, et cela quel que soit le lieu initial du transfert d'énergie. On définit la dose absorbée, qui correspond au rapport :

$$D = \frac{dEa}{dm} \quad (1.14)$$

Cette dose représente une énergie par unité de masse et se mesure donc en Gray (J/kg). La rapidité avec laquelle une dose de rayonnement est administrée est cruciale pour expliquer les effets biologiques résultant. C'est pourquoi on définit le débit de dose en Gy/s via la relation :

$$\frac{dD}{dt} = \frac{dEa}{dt} \quad (1.15)$$

Les courbes de distribution de la dose en radiothérapie

Le rendement en profondeur :

On appelle courbe de rendement en profondeur, la courbe donnant la variation de la dose absorbée en fonction de la profondeur du milieu traversé (généralement l'eau) sur l'axe du faisceau d'irradiation à une distance source-surface du milieu fixe. Cette courbe est une conséquence directe de l'atténuation décrite par l'équation 1.2. Le rendement en profondeur correspond à la variation de la dose absorbée le long de l'axe du faisceau en fonction de la profondeur du point de mesure, pour différentes tailles de champ (1.9). La distance source-surface du milieu est constante et la distance source détecteur varie avec la

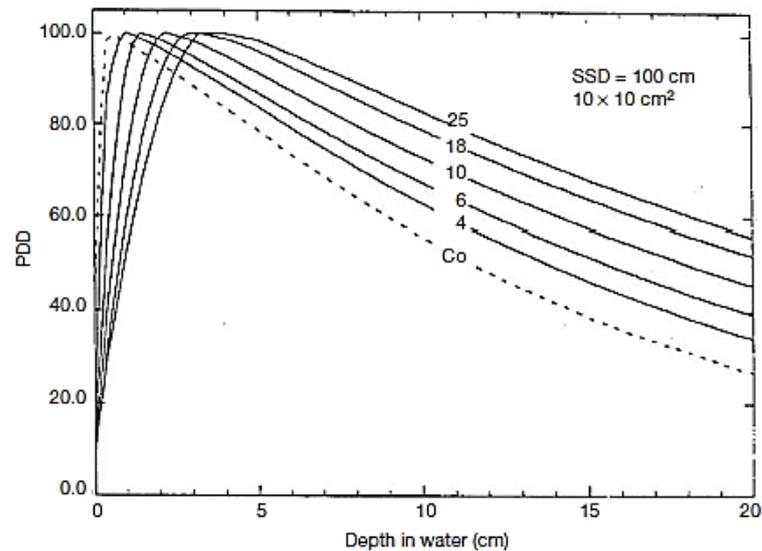


FIGURE 1.9 – Rendements en profondeur de faisceaux de photons X pour différentes énergie de faisceau 4, 6, 10, 18 et 25 MV ainsi que pour le rayonnement gamma du Cobalt 60. (PODGORSAK et AGENCY 2005)

profondeur du point de mesure. Par ailleurs ces courbes sont normalisées au point du maximum de dose. Certaines grandeurs dosimétriques peuvent être définies à partir de la courbe de rendement en profondeur : la dose à la surface, la dose de sortie et la profondeur de maximum de dose (profondeur de l'équilibre électronique).

Le profil latéral de dose :

On appelle Profil Latéral de dose, une courbe décrivant la variation de la dose absorbée en fonction de la distance dans un plan perpendiculaire à l'axe du faisceau pour une profondeur et une taille de champ donnée. Les profils de dose des faisceaux de photons MV se composent de trois parties : la région centre, la pénombre et enfin l'ombre (1.10). Nous allons détailler ci-après ces différentes régions.

La région centrale représente la zone où la dose est 100% environ de la dose délivrée. En pratique avec un LINAC la taille du champ géométrique est indiquée par un champ lumineux. Le LINAC est calibré de façon à ce que la limite de ce champ lumineux corresponde à 50 % de la dose de la région centrale. La

zone centrale correspond ainsi en pratique à la taille du champ lumineux auquel on retire de 1 à 1,5 cm. Cette région est affectée par l'énergie des électrons qui tapent la cible, par le nombre atomique de la cible et aussi par la forme et le nombre atomique du filtre égalisateur. Ce dernier permet d'obtenir un profil de dose quasiment homogène dans la partie centrale du profil de dose.

La deuxième région caractéristique est la zone de pénombre physique. Dans cette zone la dose varie rapidement. La dose totale retrouvée dans la zone de pénombre est la conséquence de trois sources individuelles de pénombre : la pénombre induite par le passage des rayonnements sur les mâchoires de collimation, la pénombre induite par la taille de la source et enfin la pénombre induite par la diffusion à l'intérieur du patient. La pénombre physique dépend de l'énergie du faisceau, de la taille du champ d'irradiation, de la taille de la source, de la distance SSD (source-surface distance), de la distance source-collimateur et enfin de la profondeur. Il est souvent admis que cette zone correspond à une dose comprise entre 20 et 80 % de la dose totale administrée.

Enfin la dernière région du profil de dose correspond à la zone d'ombre. L'ombre est la partie qui se trouve en dehors du champ d'irradiation. La dose dans cette région est généralement faible et résulte du rayonnement transmis à travers le collimateur et la tête de blindage.

En pratique le profil latéral de dose est mesuré le long des deux grands axes à différentes profondeurs et énergie dans un "fantôme" d'eau au moyen d'une chambre d'ionisation. De cette façon deux paramètres permettent de vérifier l'uniformité du champ. Il s'agit de vérifier la planéité et la symétrie du faisceau d'irradiation.

1.3 Les différents volumes en radiothérapie

Dans la suite de cette partie nous allons décrire les différents volumes considérés pour mettre en place un traitement par radiothérapie. En effet une bonne définition des volumes à traiter et protéger est un préalable nécessaire à la réalisation d'un traitement 3D par radiothérapie fiable. Ainsi pour réaliser et comprendre le traitement par radiothérapie nous devons définir les volumes cibles suivant : le GTV (Gross Tumour Volume), le CTV (Clinical Target Volume),

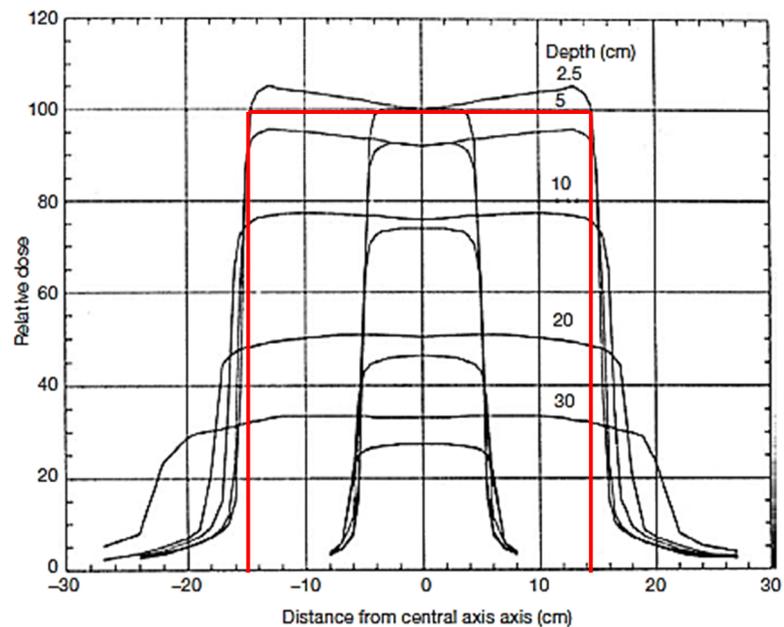


FIGURE 1.10 – Un exemple de profils de doses de faisceaux de photons X pour deux tailles de champs d'irradiations ($10 \times 10 \text{ cm}^2$ et $30 \times 30 \text{ cm}^2$) et pour une énergie de 10 MV à différentes profondeurs dans l'eau. En rouge un exemple de profil théorique parfait qui serait rectangulaire. (PODGORSK et AGENCY 2005)

le ITV (Internal Target Volume) et le PTV (Planning Target Volume). Enfin il faut aussi définir les organes à risque. La figure 1.11 montre comment les différents volumes sont reliés entre-eux.

Gross tumour volume

Le "Gross Tumour Volume" ou Volume tumoral macroscopique (GTV) correspond au volume apparent de la tumeur. Le GTV est généralement basé sur des informations obtenues à partir d'une combinaison de modalités d'imagerie (Tomographie à RX, IRM, SPECT, PET Ultrasons), des modalités de diagnostics (anatomopathologie, histologie et rapports médicaux), mais aussi de l'examen clinique.

Clinical target volume

Le "Clinical target volume" ou volume cible anatomo-clinique correspond au volume qui contient le GTV mis en évidence par l'ensemble des moyens à disposition en médecine diagnostique mais également le volume susceptible de contenir une invasion microscopique non détectable. Ce volume doit donc être traité de manière adéquate afin d'atteindre l'objectif thérapeutique (curatif ou palliatif).

Internal target volume

Le ITV consiste à prendre le CTV ainsi qu'une marge supplémentaire. Ce volume permet de prendre en compte les variations de la taille et de la position du CTV par rapport au cadre de référence du patient. Ces variations sont principalement dues aux mouvements des organes lors de la respiration ou encore lors de mouvement involontaire du patient pendant le traitement.

Planning target volume

Le "Planning target volume" ou volume cible prévisionnel inclut l'ITV et une marge supplémentaire prenant en compte les incertitudes de paramétrage de la machine ainsi que les variations entre les différentes phases du traitement. Ainsi

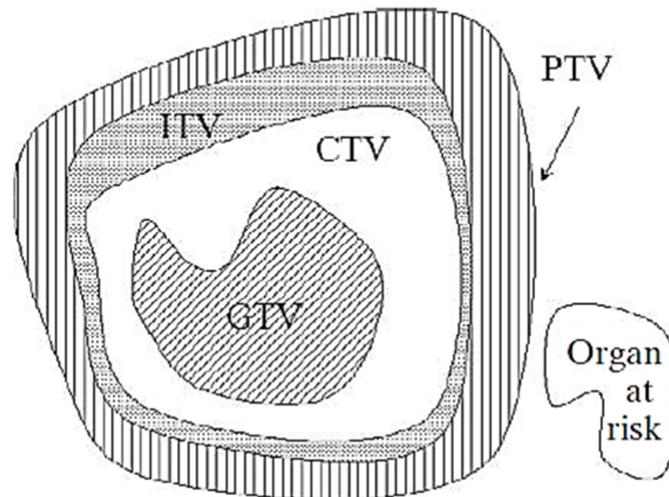


FIGURE 1.11 – Représentation graphique des volumes cibles en radiothérapie, comme définie dans "ICRU reports No. 50 and 62 (PODGORSK et AGENCY 2005) ;

- GTV : Gross tumour volume, correspondant au volume apparent de la tumeur
- CTV : Clinical target volume, correspondant au volume cible anatomo-clinique (imagerie et invasion microscopique non détectable)
- ITV : Internal target volume, correspondant au CTV auquel on ajoute une marge supplémentaire (mouvements des organes ou du patient)
- PTV : Planning target volume : cible prévisionnel incluant l' ITV et une marge supplémentaire prenant en compte les incertitudes de paramétrage de la machine utilisée et les variations entre les étapes du traitement.
- Organ at risk : organes dont la sensibilité aux rayonnements est telle que la dose reçue lors du traitement doit être totalement maîtrisée (cœur, moelle épinière...)

le PTV est souvent décrit comme étant le CTV auquel on ajoute une marge fixe ou variable (en général $PTV = CTV + 1 \text{ cm}$). Dans la pratique seul un PTV est utilisé, ceci afin d'englober un ou plusieurs CTVs. Notons que la taille du PTV dépend de la précision des outils et machines utilisés et de la précision des lasers de positionnement. Enfin le PTV ne prend pas en compte les caractéristiques dosimétriques des faisceaux de rayonnements, à savoir les zones de pénombre et de "buildup" (équilibre électronique). Par conséquent pour prendre ces effets en compte il faut ajouter une marge supplémentaire au cours de la planification du traitement.

Organes à risque

Les organes à risque sont les organes dont la sensibilité aux rayonnements est telle que la dose reçue lors du traitement doit être totalement maîtrisée. En effet ceci dans le but d'éviter au maximum les effets secondaires. Ainsi lors de la planification du traitement il faut considérer avec attention à la fois le PTV et les organes à risque qu'ils soient adjacents ou non.

1.4 Les différents types de radiothérapie conformationnelle 3D (3DCRT)

Durant ces dernières décennies la radiothérapie 2D qui utilise des champs rectangulaires selon le même principe que la radiographie à rayons X, a été largement remplacée par la radiothérapie en 3D. Cette technique 3D utilise notamment l'imagerie par tomographie ainsi que des machines de radiothérapie qui permettent de délivrer une dose en 3D en tournant autour du patient. (BASKAR et al. 2012) Ainsi le principe de base de la radiothérapie conformationnelle 3D réside dans le fait que les techniques et technologies utilisées permettent l'administration d'une dose plus élevée dans la tumeur et ceci en 3 dimensions, tout en épargnant au mieux les tissus sains environnants (« The International Commission on Radiation Units and Measurements » 2010). En fait la radiothérapie conformationnelle façonne littéralement "le volume de dose" au "volume du PTV", et ceci tout en gardant une dose reçue par les organes à risque en dessous

de leur seuil de tolérance.

1.4.1 Procédure pour la réalisation d'un traitement par radiothérapie conformationnelle 3D

Le protocole de la radiothérapie conformationnelle 3D se déroule en plusieurs étapes :

- Le contourage en 3D du volume tumoral à irradier ainsi que des organes à risque à protéger :

- la planification du traitement en 3D :

Cette planification du traitement est réalisée par des dosimétristes et physiciens médicaux qui utilisent comme outil principal des logiciels de calculs de dosimétrie associés aux images en 3D du patient. Il est alors question de simuler la dose prescrite par le médecin dans le PTV en fonction du nombre de faisceaux d'irradiation, de leurs positionnements, et de leurs énergies et de leurs formes. Une fois l'équilibre trouvé entre dose prescrite dans le PTV et dose reçue dans les tissus sains et organes à risque, le traitement est validé par le médecin.

- la délivrance de la dose en 3D :

La délivrance de la dose doit être conforme à la simulation validée par les dosimétristes, physiciens et médecins. L'ensemble des paramètres d'irradiation sont gérés par ordinateur et le traitement du patient est entièrement automatisé. En radiothérapie moderne et 3D les accélérateurs linéaires de particules sont équipés de collimateurs multi-lames. Ces collimateurs se composent de 20 à 60 lames en tungstène qui butent entre-elles. Ce type de collimateur permet de façonner des champs de forme irrégulière. Chaque lame est motorisée individuellement et contrôlée par ordinateur, ce qui permet de les positionner avec une très bonne précision (1 mm). De plus il est possible pour le bras de l'accélérateur de tourner autour du patient et donc de délivrer le rayonnement sous des angles multiples conformément à la simulation. En radiothérapie conformationnelle 3D classique, il est courant d'utiliser un nombre limité de faisceaux de photons X (de 2 à 4), dont on fixe l'orientation.

1.4.2 Les nouveaux types de radiothérapie conformationnelle

La radiothérapie à modulation d'intensités (IMRT)

La technique IMRT est une radiothérapie conformationnelle 3D améliorée. Avec les nouvelles générations d'accélérateurs de particules, l'intensité des faisceaux d'irradiation peut être modifiée pendant le traitement pour délivrer au mieux la dose dans le volume cible. Cette technique a notamment permis des améliorations dans le traitement des cancers du cou (FENG et al. 2007), de la prostate (WANG-CHESEBRO et al. 2006) ainsi que dans les cancers gynécologiques (ROESKE et al. 2000).

Dans cette technique l'étape de dosimétrie est différente de la méthode classique, dans la mesure où la simulation du traitement se fait non plus à travers la gestion des paramètres des faisceaux d'irradiation, mais par une technique de planification dite inversée. En effet le travail du dosimétriste et du physicien réside dans l'optimisation de la dose reçue par chaque volume d'intérêt (PTV et organes à risque). En d'autres termes la dosimétrie consiste à paramétrer des contraintes minimum et maximum sur la dose reçue par chaque volume d'intérêt et le logiciel de calcul de dosimétrie simule le meilleur compromis concernant l'ensemble des paramètres d'irradiation (nombre, forme et intensité des faisceaux d'irradiation).

Cependant dans cette technique on utilise un plus grand nombre de faisceaux que dans la technique 3D classique et donc un plus grand volume de tissu sain est affecté par les irradiations. Cela pourrait donc poser des problèmes en termes d'effets secondaires retardés.

La radiothérapie guidée par l'imagerie

Avec ces améliorations technologiques, l'irradiation des cibles peut se faire en réduisant les marges. mais cela peut poser un problème, en effet il est possible de rater des cellules cancéreuses à cause du mouvement des organes du patient et de la position de celui-ci entre chaque séance de traitement (LANGEN et JONES 2001). La radiothérapie guidée par l'image permet de corriger ces erreurs de positionnement avant chaque séance et même pendant la séance de radiothérapie.

Par exemple grâce au tomodensitometre installé sur la machine de radiothérapie, il est possible avant chaque traitement de réaliser une imagerie scanner du patient pour corriger les erreurs de positionnement (JAFFRAY et al. 2002). Cela a notamment permis d'améliorer le traitement des cancers de la tête et du cou (DUMA et al. 2010) et de la prostate (BARNEY et al. 2011).

La radiothérapie stéréotaxique

Encore une fois, avec les progrès technologiques certains accélérateurs linéaires sont aujourd'hui en mesure de produire des mini-faisceaux d'irradiation de quelques millimètres carrés à quelques centimètres carrés seulement. L'utilisation de ces machines permet de délivrer une forte dose sur un petit volume en quelques séances d'irradiation seulement. Cela permet le traitement de petites tumeurs primaires et métastatiques partout dans le corps comme les petites tumeurs de la tête, du cou, hépatique, rénale, de la moelle et du pancréas (LO, FAKIRIS et al. 2010, TIPTON et al. 2011, WU et al. 2008, FREEMAN et KING 2011). La radiothérapie stéréotaxique a montré de très bons résultats dans le traitement de cancers du poumon à petites cellules à un stade précoce. Enfin comme la quantité de tissu sain adjacent est faible on relève une faible toxicité de ce type de traitement (LO, MOFFATT-BRUCE et al. 2011).

Ainsi en radiothérapie il est question de tout mettre en oeuvre pour cibler les cellules tumorales tout en préservant au maximum les tissus sains et les organes à risque. Durant ces dernières décennies, la radiothérapie a fait de considérables avancées avec notamment d'importants progrès technologiques. La performance des outils informatiques, associée aux nouvelles générations d'accélérateurs de particules permet aujourd'hui d'assurer un traitement optimal des volumes tumoraux. En effet, les techniques les plus avancées offrent aujourd'hui la possibilité de façonner, et ceci littéralement, les faisceaux d'irradiation aux volumes complexes, et donc permettent une meilleure stérilisation des cellules cancéreuses et une meilleure protection des tissus sains, avec pour conséquence une meilleure chance de guérison à long terme sans effets secondaires.

Cependant bien que les techniques se soient considérablement améliorées, les effets secondaires sont toujours présents du fait de la traversée du rayonnement dans les tissus sains. L'effet secondaire le plus dramatique étant la survenue de cancers secondaires en territoire irradié. Il est donc nécessaire de continuer à comprendre les effets des rayonnements sur les tissus biologiques. La deuxième partie de cette introduction portera sur les effets biologiques des rayonnements ionisants.

Effets biologiques induits par Rayons X

Dans cette partie il est question d'exposer certains aspects fondamentaux de la biologie et de la radiobiologie. Cette introduction reprend des notions bien connus dans ces domaines sans être exhaustif et est construite en partie à partir de ce que l'on trouve dans les ouvrages qui font références dans ces domaines tels que : TUBIANA 2009, JOINER et KOGEL 2009.

2.1 Dommages à l'ADN induits par les rayonnements ionisants de type photon

2.1.1 Chimie de l'ADN

Il y a 3×10^6 paires de bases par mm de molécules d'ADN nucléaire, soit environ 3×10^9 paires de bases dans 1 m d'ADN nucléaire d'une cellule humaine diploïde. L'ADN mitochondrial contient seulement 16569 paires de bases.

Dans le noyau de la cellule diploïde humaine, l'ADN est réparti en 46 chromosomes, soit 22 paires de chromosomes autosomiques plus une paire de chromosomes sexuels, XY chez l'homme et XX chez la femme. Le génome comporte environ 30000 gènes. Un chromosome comporte un centromère et deux télomères situés aux deux extrémités. Les centromères jouent un rôle important pour

maintenir ensemble les deux copies d'un chromosome dupliqué et le moment venu lors de la mitose pour les attacher au fuseau mitotique avant la distribution de chaque copie à une cellule-fille. Les télomères quand à eux jouent un rôle important notamment dans la protection de l'information génétique au cours des divisions cellulaires successives.

Dans les noyaux des cellules des organismes supérieurs, ou eucaryotes, la molécule d'ADN est liée à des protéines pour former la chromatine. Cette chromatine se condense pour former des chromosomes. L'ADN est enroulé sur 2 à 3 tours de 146 à 260 paires de bases autour d'un octamère d'histones formant ainsi des cores reliés entre-eux par un segment d'ADN ou linker (ADN de liaison). Un core et le linker forment un nucléosome de 7 à 10 nm de diamètre. Cette structure se contracte sur elle-même par surenroulement pour constituer des fibres de 30 nm de diamètre qui s'organisent en boucles de chromatine s'enroulant en nombre de 6 en forme de rosettes. Celles-ci forment une fibre de 300 nm de diamètre qui s'enroule à nouveau en spirales pour former les chromosomes d'un diamètre de 1 à 1.5 μm visibles au microscope dans les cellules en division (voir figure 2.2).

Chimiquement, un brin d'ADN est composé d'une chaîne de nucléotides reliés par des ponts phosphodiester. Un nucléotide se compose d'une base azotée de type purique (adénine ou guanine), ou pyrimidique (thymine ou cytosine), et d'un sucre (désoxyribose) lié à un groupement phosphate. La liaison phosphodiester est le résultat de l'élimination d'une molécule d'eau entre un OH en 5' de l'acide phosphorique d'un nucléotide et l'H de la fonction alcool située en 3' du désoxyribose d'un autre nucléotide. Il en résulte que lorsque deux nucléotides sont assemblés les deux fonctions acide (OH) de l'acide phosphorique sont engagées dans des liaisons esters. C'est pour cela que l'on parle de liaison phosphodiester. De fait donc, l'ADN possède donc une polarité avec une extrémité 3' OH et une extrémité 5' phosphate. L'ADN est formé de deux brins de polarité opposée qui forment la double hélice. La formation de cette double hélice est rendue possible grâce à l'établissement de liaisons hydrogènes entre les bases complémentaires, à savoir A avec T et G avec C (voir figure 2.1).

La stabilité de la double hélice de l'ADN est assurée d'une part par les forces de Van der Waals parallèles à l'axe de l'hélice (les interactions dites de

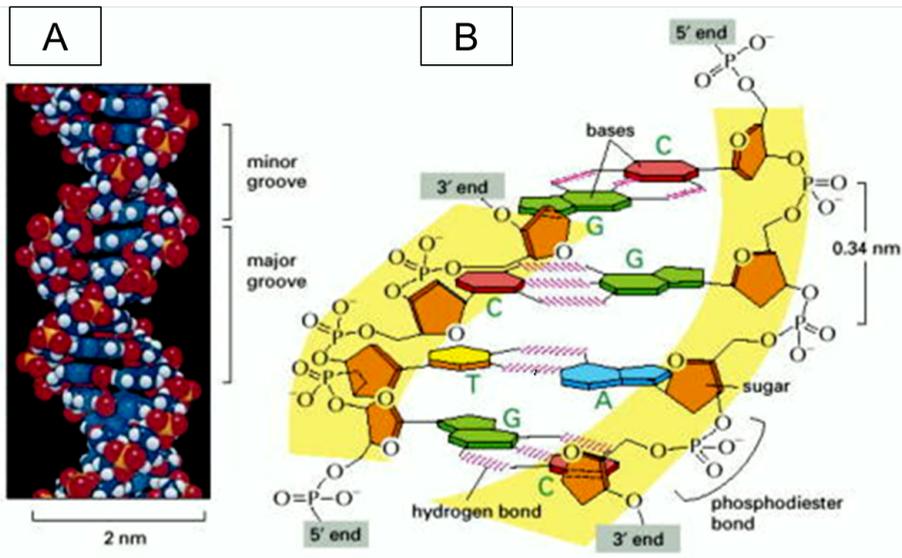


FIGURE 2.1 – Une molécule d'ADN est formée par deux brins d'ADN qui s'associent en orientation opposée, avec les bases orientées vers l'intérieur et les squelettes sucre-phosphate en surface. Les 2 brins s'enroulent en double hélice. La double hélice est stabilisée par des liaisons hydrogène qui s'établissent entre les bases : les bases A ne peuvent s'apparier qu'avec les bases T, et les bases C qu'avec les bases G. De ce fait, on dit que les 2 brins d'ADN sont de séquence inverse complémentaire. L'enroulement en double hélice crée deux sillons, un majeur et un mineur.

- A : modèle en boule de la double hélice. blanc = H, rouge = O, gris = C, jaune = P, bleu = N, vert = S
- B : Schéma de la structure en double hélice

π -stacking, provenant des orbitaux π des hétérocycles aromatiques, empilés verticalement) ce qui assure une cohésion de chaque brin d'ADN et d'autre part par les ponts hydrogènes perpendiculaires à l'axe de l'hélice et responsables de l'appariement des bases nucléotidiques et donc de la cohésion des deux brins entre-eux. Les deux chaînes, contenant les liaisons sucre-phosphate et les séquences nucléotidiques complémentaires avec positionnement des bases à l'intérieur, sont enroulées d'une façon anti-parallèle formant ainsi une double spirale d'un diamètre de 2 nm avec un tour d'hélice de 3.4 nm et une distance entre les paires de bases de 0.34 nm. La séquence des bases et l'enroulement de la molécule conditionnent les caractéristiques physiques de la molécule d'ADN (flexibilité, écartement, séparation et surenroulement).

La dénaturation de l'ADN, ou fonte de l'ADN, est un processus qui conduit à transformer un double brin d'ADN en deux simples brins, en rompant les liaisons hydrogène entre les bases nucléiques des deux chaînes complémentaires de l'ADN. Cette dénaturation peut être réalisée in vitro en soumettant l'ADN à tout agent chimique ou physique capable de déstabiliser les liaisons faibles. Dans le cas du pH par exemple, la molécule d'ADN est bicaténaire à pH neutre autour de 7 et elle est monocaténaire pour un pH alcalin élevé autour de 12-13. La dénaturation de l'ADN est parfaitement réversible, lors d'un retour suffisamment lent aux conditions initiales : les bases se réappariaient naturellement. C'est la renaturation, ré-association des deux brins de l'ADN qui se recombinent en une seule molécule bicaténaire.

2.1.2 Les dommages induits à l'ADN par les rayonnements ionisants

Les rayonnements ionisants quand ils traversent les cellules induisent de nombreux types de dommages comme des cassures simple-brin (CSB) et cassure double-brin (CDB), des modifications de bases, des sites abasiques, des pontages ADN-ADN ou ADN-protéines (2.5). Si des cassures et des dommages oxydatifs sont concentrés sur une distance de 10 à 20 nucléotides on parle de dommages multiples localisés (LMDS). (GOODHEAD 1994 ; WARD 1995).

Dans mon travail de thèse nous nous sommes focalisés sur les CSB et CDB de

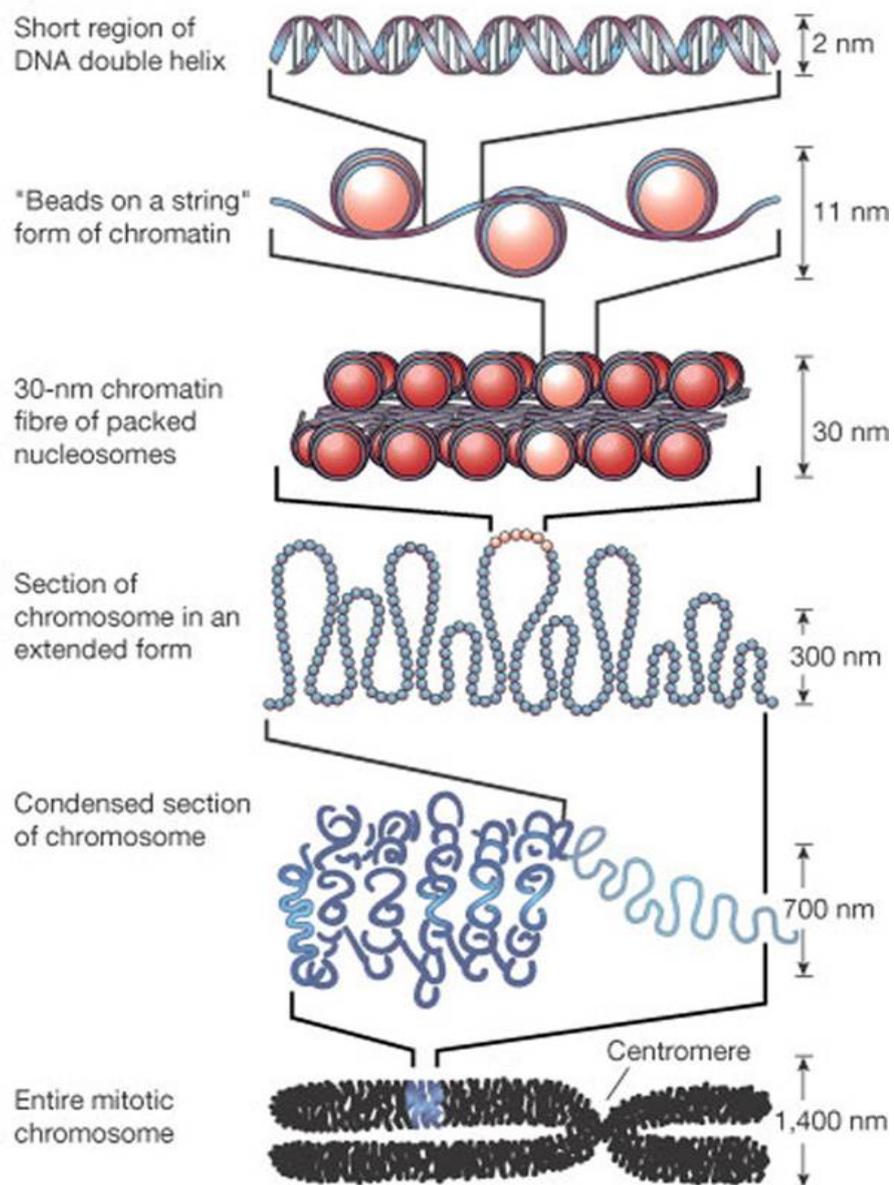


FIGURE 2.2 – Les différents niveaux d'enroulement de l'ADN (FELSENFELD et GROUDINE 2003) :

l'ADN. En effet les CSB sont très nombreuses et potentiellement mutagènes mais de manière assez étonnante peu d'études portent sur leur possible impact dans les phénomènes de cancérisation. A contrario les CDB ont été déjà très étudiées. Elles sont peu nombreuses mais sont considérées comme les dommages les plus létaux pour la cellule. Ainsi pour la problématique des cancers secondaires en territoire irradiée il nous a semblé intéressant de comparer la survenue de ces deux types de dommages qui pourraient avoir des conséquences différentes sur le devenir cellulaire.

Les cassures simple-brin de l'ADN

Les cassures simple-brin se caractérisent par une discontinuité affectant un seul des deux brins de l'ADN. Le plus souvent elle survient au niveau de la liaison phosphodiester entre le phosphate et le désoxyribose (CALDECOTT 2008). Dans le cas d'une CSB la structure en double hélice n'est pas altérée, cependant il y a un endommagement des extrémités 3' et 5'. Les CSB sont des lésions très fréquentes, en effet on estime leur nombre à quelques dizaines de milliers par cellule et par jour induit par le seul stress endogène et métabolique. Le nombre de CSB radio-induites est de l'ordre de 1000 par Gy.

Ces lésions peuvent survenir soit par action directe, soit par action indirecte des rayonnements ionisants. Ce sont les lésions les plus fréquentes produites par action indirecte avec le rendement radiochimique in vitro le plus élevé. La CSB survient souvent à la suite de l'abstraction d'un atome d'hydrogène du ribose par le radical OH^\bullet , voire l'adduction du même radical portant à la formation d'une base oxydée. La radiochimie des réactions impliquant les radicaux libres est énormément complexe, et elle commence à être éclaircie depuis seulement quelques années dans quelques aspects particuliers. La figure 2.3 montre les effets principaux suivant l'oxydation de l'hélice. En (a) on voit l'attaque du radical OH^\bullet au carbone C5' du ribose, en présence d'oxygène, donnant une cassure avec l'extrémité 5' saturée par une aldéhyde $-\text{HC}=\text{O}$; en (b) l'attaque au carbone C4' par contre, avec une chaîne chimique plus complexe, porte à un état final avec l'extrémité 3' saturée par un phosphoglycolate, i.e. un $-\text{CH}_2\text{COO}^-$ attaché au groupe phosphate; en (c) on montre un exemple de réaction réductrice par un

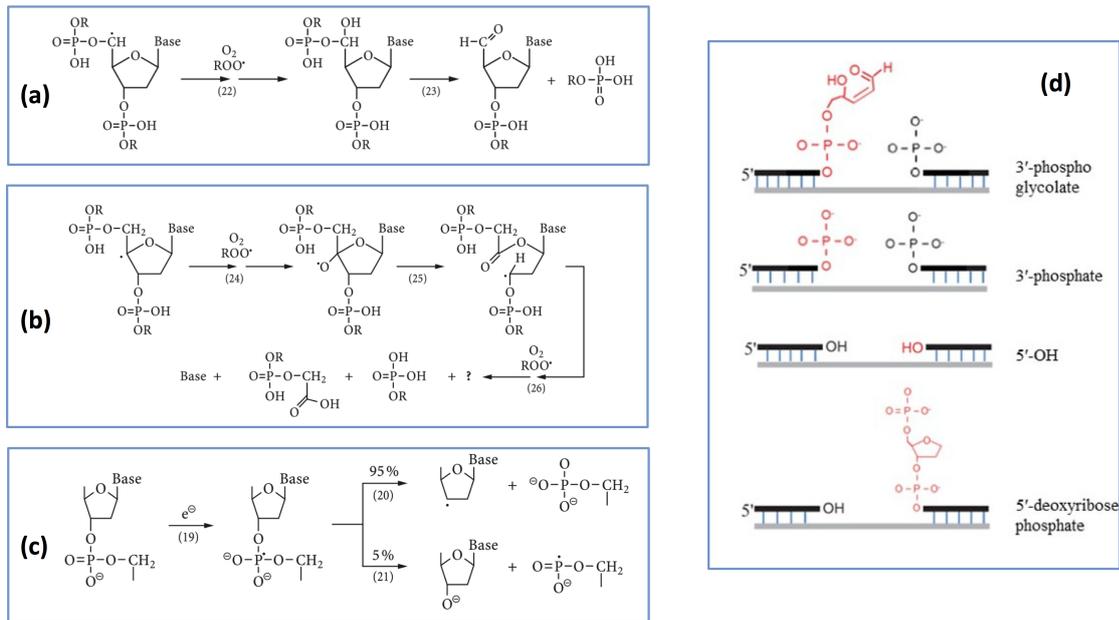


FIGURE 2.3 – Exemples de réactions avec radical OH^{\bullet} (a et b) et électron libre (c), portant à la formation d'une cassure simple brin dans l'hélice de l'ADN. (d) Exemples des terminaisons aux bornes 5' et 3' suivant la création d'une cassure CSB. (SONNTAG 2006)

électron libre. Les états finaux du brin d'ADN ayant subi la rupture peuvent présenter des terminaison diverses, et non standard (dans le sens de Watson et Crick), qui devront être coupées et ajustées par les protéines au début de la chaîne de réparation.

Dans le cas de l'action directe, l'énergie requise pour provoquer une CSB est classiquement de l'ordre de 10 à 20 eV. Le taux de formation de CSB est linéaire en fonction de la dose et est plus élevé à faible TEL qu'à haut TEL. Leur réparation dans les cellules de mammifère est très rapide et leur induction n'a pas d'impact direct sur la létalité (HOEIJMAKERS 2001). Les CSB sont mises en évidence par diverses techniques : élution alcaline, chromatographie alcaline, électrophorèse en milieu alcalin et essai comète (OLIVE 1992 ; COLLINS 2004).

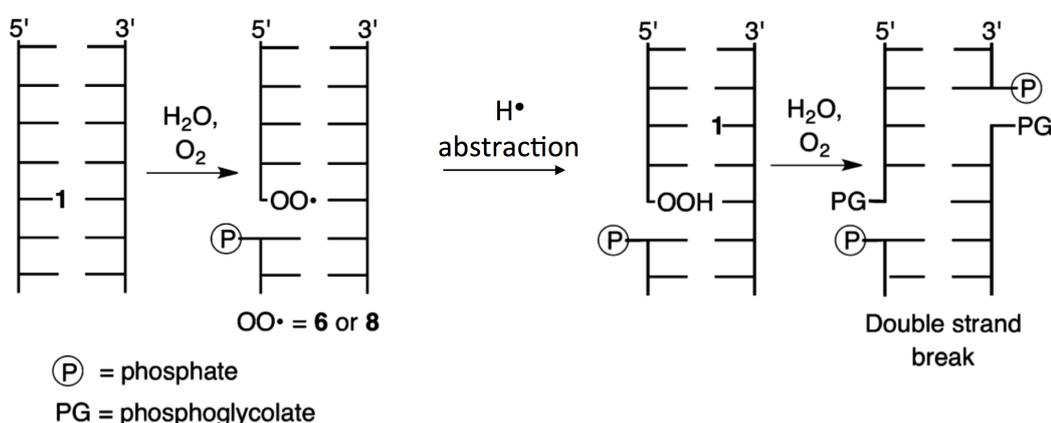


FIGURE 2.4 – Mécanisme proposé pour la formation d'une CDB en partant d'un événement unique d'oxydation, le radical $\text{OH}\cdot$ ayant créé en premier un radical en position C4' (indiqué par 1), qui est ensuite transféré d'une hélice à l'autre, assisté par la présence de molécules d'eau et oxygène libre. (TAVERNA PORRO et GREENBERG 2013)

Les cassures double-brin de l'ADN

Les cassures double-brin se caractérisent quant-à elles par une discontinuité affectant les deux brins de l'ADN à des sites distants de quelques nucléotides, ce qui provoque la rupture de la double hélice. Les CDB sont considérées comme étant les dommages les plus importants en termes d'effets sur la vie cellulaire puisqu'elles menacent directement l'intégrité génétique. Contrairement aux CSB ces dommages sont beaucoup moins fréquents, avec seulement en moyenne 8 CDB par cellule et par jour induit par stress endogène et métabolique. Le nombre de CDB radio-induites est de l'ordre de 40 par Gy. De la même façon que pour les CSB, les CDB peuvent survenir soit par action directe, soit par action indirecte des rayonnements ionisants.

Dans le cas de l'action indirecte, Les CDB sont formées soit par l'action d'un seul radical $\text{OH}\cdot$ sur le désoxyribose avec transfert du radical sur le deuxième brin, soit par l'attaque de l'ADN par plusieurs radicaux hydroxyls formés sur la trajectoire de la même particule dans des sites voisins (DIKOMEY et al. 1998). La formation de CDB joue un rôle déterminant dans la létalité radio-induite (FRANKENBERG-SCHWAGER 1989 ; ILIAKIS 1991 ; DIKOMEY et al. 1998). Leur

Type de dommage à l'ADN	Dommages endogènes (37°C, métabolisme)	Dommages radio-induits (rayonnement ionisant) Direct et indirect
	Taux de lésions induites par cellule et par jour	Fréquence de lésions par génome (2n)/Gy
Cassures simple-brin	55000	1000
Cassures double-brin	8	40
Pertes de bases puriques	12000	
Pertes de bases pyrimidiques	600	
Pontage ADN/ADN	8	30
Pontage ADN/protéine	Quelques-uns	150
Dommages de bases		
Total	> 4200	2000
Déaminations de la cytosine	200	
Oxydations de bases	>1000	
Méthylations de la guanine	3000	

FIGURE 2.5 – *Quantité de dommages endogènes versus radio-induits à l'ADN par jour et par cellule (WARD 1988 ;BURKART, JUNG et FRASCH 1999)*

génération est proportionnel à la dose (BLÖCHER, EINSPENNER et ZAJACKOWSKI 1989 ;ILIAKIS 1991). Ceci est une preuve qu'une CDB n'est pas une somme statistique de deux CSB produites à proximité (dans ce cas le nombre de CDB devrait plutôt être quadratique avec la dose).

2.2 Signalisation et réparation des CSB et CDB

Pour faire face aux dommages de l'ADN la cellule possède plusieurs systèmes enzymatiques plus ou moins complexes de réparation des dommages. La capacité de ces systèmes à faire face aux nombreuses lésions induites par le fonctionnement normal de la cellule ou par des expositions à des agents génotoxiques physiques et chimiques est essentielle pour la vie cellulaire. En effet des anomalies de fonctionnement sont la cause de la mort cellulaire, d'anomalies de développement, d'un vieillissement précoce, d'instabilité génétique et d'ini-

tiation de cancer. Ces systèmes peuvent être divisés en deux parties utilisant en premier les senseurs et en deuxième les effecteurs de la réparation de l'ADN. Les senseurs constituent un groupe de protéines qui surveillent activement le génome dans le but de découvrir des lésions de l'ADN. Une fois les dommages à l'ADN repéré par ces protéines senseurs, 3 groupes de voies effectrices sont alors possibles :

- 1) soit des voies de réparation des cassures qui passent par un arrêt temporaire du cycle cellulaire
- 2) soit des voies qui entraînent un arrêt définitif du cycle cellulaire
- 3) soit des voies de mort cellulaire programmée.

La condensation de l'ADN dans la chromatine ne facilite pas la réparation des dommages par la cellule. En effet, les protéines spécialisées dans la réparation doivent être suffisamment abondantes et mobiles pour détecter les dommages quelques secondes ou quelques minutes après la création de ceux-ci. Deuxièmement, en général la structure de la chromatine doit être ouverte pour permettre l'accès aux protéines de réparation (ATTIKUM et GASSER 2005). Par suite, les protéines de signalisation et de réparation doivent être recrutées dans un ordre bien précis. Les modifications aux histones sont hautement impliquées dans l'organisation de ces phénomènes.

Nous allons voir ci-après plus spécifiquement la réparation des CDB et des CSB de l'ADN qui ont été particulièrement recherchées dans ce travail de thèse.

2.2.1 La réparation des cassures double brin de l'ADN

La réparation des CDBs implique la voie DDR (DNA damage response) laquelle tend à maintenir la viabilité cellulaire et la stabilité génétique. La réparation des CDBs implique la participation de plusieurs composants qui peuvent être classés dans les catégories suivantes : les senseurs/transducteurs du signal (ATM, γ H2AX, MRN,...), les médiateurs (MDC1, 53PB1, BRCA1,...) et les effecteurs (p53,...). Quelques minutes après la génération d'une CDB, la chromatine est modifiée et l'ensemble de ces protéines est recruté au site de la cassure pour former des IRIFs « Ionizing Radiation Induced Foci » (BEKKER-JENSEN et MAILAND 2010). Une première étape clé pour la formation des IRIFs est la reconnais-

sance de la CDB par le complexe MRN (Mre11-Rad50-Nbs1)(LAMARCHE, ORAZIO et WEITZMAN 2010). MRN interagit ensuite avec ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) en favorisant son accumulation au site de la CDB et son autophosphorylation sur un résidu sérine 1981. L'autophosphorylation de ce dernier contribue à la dissociation de sa forme latente dimérique en une monomérique active (SO, DAVIS et CHEN 2009). Une fois activé, ATM phosphoryle à son tour la variante H2AX de l'histone H2A sur un résidu sérine 139 pour former ce qui a été appelé des foyers γ H2AX dont le nombre correspond au nombre des CDB (BEKKER-JENSEN et MAILAND 2010). Ensuite, la protéine MDC1 (Mediator of the DNA Damage Checkpoint 1) est recrutée pour interagir avec γ H2AX via son domaine BRCT. Elle protège γ H2AX de la déphosphorylation, stabilise l'interaction ATM-chromatine endommagée, interagit avec le complexe MRN (SPYCHER et al. 2008) et organise le recrutement du reste des facteurs de l'IRIF en favorisant la propagation de signal. De plus, MDC1 est impliquée dans le recrutement des E3 ubiquitine-ligases RNF8 qui, avec une autre ligase, la RNF168, ubiquitinent les histones H2A et H2AX. La modification de ces histones est cruciale pour le recrutement des deux dernières protéines de l'IRIF, 53BP1 (p53-Binding Protein 1) et BRCA1 (Breast Cancer Gene 1) (2.6) (BEKKER-JENSEN et MAILAND 2010).

BRCA1 est une protéine suppresseur de tumeurs qui joue un rôle clé dans l'arrêt du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN via l'activation du point de contrôle G2-M. De plus des études suggèrent que BRCA1 pourrait avoir un rôle d'une protéine scaffold qui favorise la formation des complexes de réparation aux sites de la CDB (LOMBARD et al. 2005). 53BP1, quant à elle, est une protéine qui interagit avec le domaine de liaison à l'ADN de p53 en le stabilisant et en renforçant son activité transcriptionnelle (ABRAHAM 2002). L'activation de p53 contribue à un arrêt du cycle cellulaire ou à la mort cellulaire qui peut s'ensuivre. Deux voies de réparation existent qui sont recrutées par 53BP1 et BRCA1 : la jonction des extrémités non-homologues (NHEJ) et la recombinaison homologue (RH). Le premier mécanisme permet de restaurer la continuité de la molécule d'ADN mais est générateur d'erreurs dans le sens où une partie de l'information génétique peut être perdue après la réparation de la lésion à travers des délétions de petites séquences d'une dizaine de nucléotides ; le deuxième mécanisme est par contre très fidèle, parce que la réparation met en

jeu des séquences d'ADN homologues à la séquence endommagée, présentes sur la chromatide sœur ou sur le chromosome homologue (HELLEDAY et al. 2007). Cependant, une réparation par RH favorise une perte d'hétérozygotie. Une réparation anormale peut également intervenir, ce qui génère des translocations chromosomiques. Une non-réparation de ces cassures maintient la voie DDR activée ce qui provoque un arrêt permanent du cycle cellulaire ou l'apoptose (AGUILERA et GÓMEZ-GONZÁLEZ 2008).

2.2.2 La réparation des cassures simples brins de l'ADN

Pour réparer les CSB les cellules ont développé une voie spécifique de réparation appelée "single strand break repair" (SSBR) (Fortini and Dogliotti, 2007)(voir figure 2.6). La détection de la cassure est faite par une polyADP ribose polymérase, PARP1 majoritairement et PARP2. Une fois activée par la présence de la cassure, cette enzyme nucléaire catalyse l'hydrolyse de NAD⁺ (nicotinamide adénine dinucléotide) en nicotinamide et mono(ADP)ribose, la fixation du mono(ADP)ribose sur des protéines réceptrices, et la polymérisation des mono(ADP)riboses en longues chaînes chargées négativement nommées poly(ADP) ribose ou PAR. Les cibles de la PARylation sont la PARP1 elle-même (auto-ribosylation) ainsi que les histones nucléosomiques et l'histone H1 (J. KIM et al. 2005). Les PAR ainsi accumulés forment des foyers au site de la cassure. Ils favorisent le recrutement de la protéine scaffold XRCC1 (X Ray Repair Cross-Complementing Group 1)(EL-KHAMISY et al. 2003) qui elle-même recrute des protéines de réparation comme la polynucléotide kinase phosphatase PNKP (WHITEHOUSE et al. 2001), les polymérases β , δ et ϵ les ligases 1 et 3 α (CALDECOTT et al. 1996) et PCNA (FAN et al. 2004). La PNKP est l'enzyme principalement impliquée dans la restauration des extrémités 3' et 5' endommagées de la CSB en extrémités conventionnelles 3'hydroxyle et 5'phosphate. La réparation est finalisée par une étape de polymérisation et de ligation. Deux mécanismes peuvent être mis en jeu. La réparation par brèche courte (short patch repair) qui met en jeu l'insertion d'un seul nouveau nucléotide et qui implique la polymérase β et la ligase 3, et la réparation par brèche longue (long patch repair) qui implique le déplacement et le remplacement de quelques dizaines de nucléotides

principalement par les polymérases δ , ϵ et la ligase 1 (CALDECOTT 2008). La réparation des CSB est génératrice de mutations ponctuelles via les erreurs des polymérases (CALDECOTT 2008). Une CSB non réparée peut être convertie en CDB lors du passage de la fourche de réplication (KUZMINOV 2001). Elle peut alors être réparée par recombinaison homologue. Alternativement, une CSB non réparée peut bloquer le cycle cellulaire en phase S (CALDECOTT 2008).

2.2.3 Lien entre CSB et CDB

Les CSB peuvent conduire à la formation de CDB par deux voies principales. Premièrement, les dommages induits par les radiations ionisantes arrivent souvent en "cluster" (GOODHEAD 1994). Ainsi il n'est pas difficile de rencontrer un dommage se produisant sur une base de l'ADN à proximité d'une CSB. Durant la réparation du dommage de la base par "Base Excision Repair" (BER), une CSB est formée temporairement. Il a été démontré que si le dommage de base est opposé à la cassure simple brin induite par les radiations, alors la CSB formée durant la "BER" se combine avec la CSB induite par radiation pour former une CDB (MA et al. 2013). Deuxièmement, si une CSB est générée durant la phase S du cycle cellulaire, alors la progression de la fourche de réplication sera stoppée par cette CSB radio-induite, avec pour conséquence une rupture de la fourche de réplication et la génération d'une CDB particulière appelée "one-ended" (KUZMINOV 2001). La cellule tente alors la réparation de ces CDB par "HR". En effet dans ce dernier cas la réparation par NHEJ est impossible puisqu'il n'y a qu'un seul fragment double brin.

Ce dernier mécanisme a une pertinence clinique forte depuis qu'il a été montré que les drogues qui inhibent PARP, sont particulièrement efficaces contre les tumeurs qui présentent une déficience du mécanisme de "HR", telles que les tumeurs mammaires avec une déficience de BRCA1 et BRCA2 (ZHANG et POWELL 2005). Cette efficacité tient du fait que l'inhibition de PARP supprime la capacité de réparation des CSB, qui ont plus de chance de provoquer une rupture des fourches de réplication et donc de générer des CDB. Dans des conditions normales les CDB seraient réparées par "HR", mais ce mécanisme étant déficient dans les tumeurs ciblées, les CDB augmentent de manière considérable

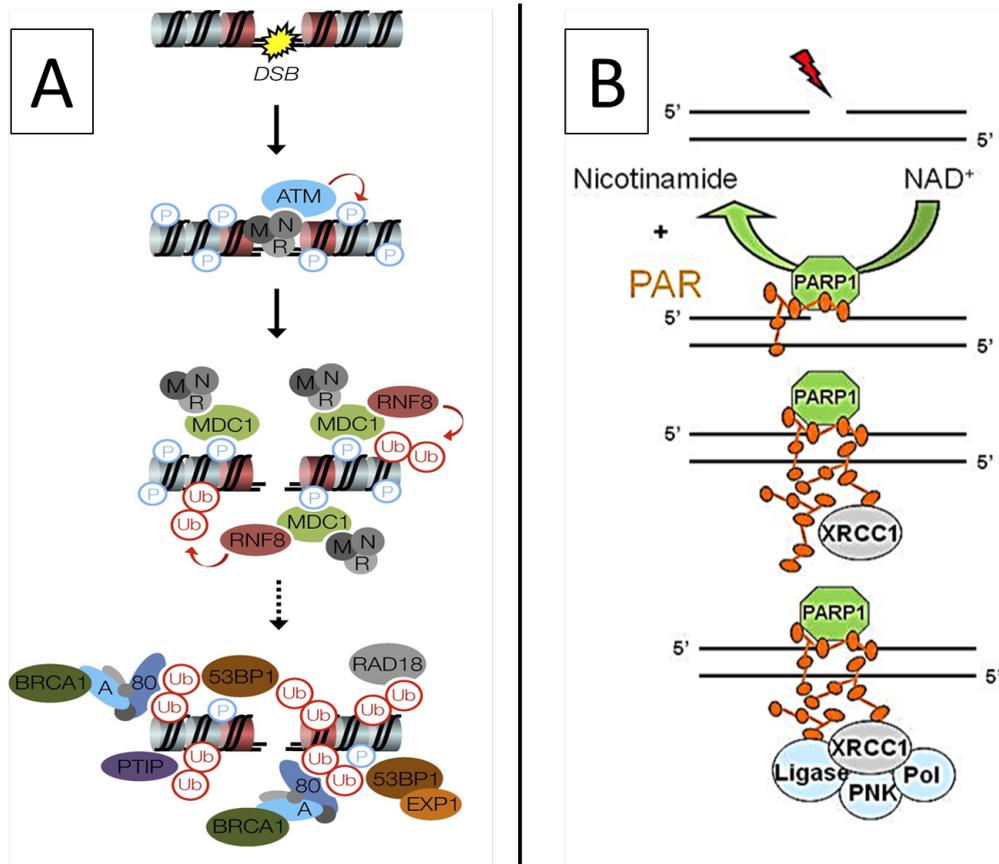


FIGURE 2.6 – Voie de signalisation des cassures double-brin (BEKKER-JENSEN et MAILAND 2010) et simple-brin (CALDECOTT 2007).

- Panel A : Génération de la DSB. Décondensation de la chromatine. Le complexe MRN se lie à la DSB. MRN recrute active ATM qui phosphoryle l'histone H2AX. MDC1 se lie à γ H2AX. Elle recrute et stabilise RNF8, ATM et MRN en permettant la propagation de la phosphorylation de H2AX. RNF8 avec une autre E3 ubiquitine ligase, RNF168, ubiquitinent les histones H2A et H2AX. 53BP1 et BRCA1 se lient aux histones ubiquitinées.
- Panel B : Génération de la SSB. PARP1 se lie à la SSB et s'active. Elle catalyse l'hydrolyse de la NAD⁺ en nicotinamide et mono(ADP)ribose et la polymérisation des mono(ADP)riboses en poly(ADP)ribose ou PAR. PARP1 s'automodifie. XRCC1 est recruté et interagit avec la forme modifiée de PARP1 via les PAR. XRCC1 recrute et stabilise les protéines de réparation (ligases, PNK et polymérase) au site de la cassure.

et entraînent davantage de mortalité cellulaire.

2.3 Conséquence des cassures de l'ADN radioinduites sur le cycle cellulaire

2.3.1 Le cycle cellulaire

L'étude du cycle cellulaire se concentre sur les mécanismes qui régulent le rythme et la fréquence de duplication de l'ADN et de la division cellulaire. En tant que concept biologique, le cycle cellulaire est la période entre chaque division d'une cellule. Bien que le processus de division cellulaire était connu depuis une centaine d'années par les biologistes, c'est seulement dans les années 1950 que les travaux de Alma Howard et Stephen Pelc ont mis en évidence que la réplication de l'ADN se produisait dans une phase spécifique du cycle cellulaire et que cette phase était clairement séparée du processus de séparation physique des deux cellules filles appelé mitose. Ils ont également montré par la suite que la cellule passe par plusieurs phases discrètes avant et pendant le processus de division cellulaire. Aujourd'hui on sait clairement distinguer les différentes phases du cycle cellulaire, qui sont la mitose (M), la phase G1, la phase S et la phase G2. L'étude de ces différentes phases, des protéines impliquées dans leur déroulement, ainsi que les interactions biochimiques complexes mises en jeu sont les principales préoccupations des biologistes spécialistes du cycle cellulaire. La phase G1 qui est la plus longue correspond à une phase de croissance de la cellule mère. Cette phase de croissance cellulaire est suivie par la phase S pendant laquelle la cellule mère duplique son ADN (phase de synthèse). Ensuite vient la phase G2 qui correspond de nouveau à une phase de croissance qui permet la préparation à la phase M ou mitose. Pendant la phase M la cellule mère se divise physiquement et partage les chromosomes préalablement dupliqués, ceci pour donner naissance à deux cellules filles identiques génétiquement. A la fin de la phase G1 et de la phase G2, il existe des points de contrôle, ou "checkpoints". Pendant ces contrôles la cellule vérifie que la réplication de l'ADN et la mitose se déroulent correctement. Si ce n'est pas le cas il existe alors 3

possibilités :

- 1) Un blocage réversible du cycle cellulaire
- 2) Un blocage irréversible du cycle cellulaire
- 3) La mort cellulaire

La phase de quiescence G₀ aussi appelée phase G₁ prolongée est un état dans lequel la cellule n'effectue ni réplication de l'ADN, ni mitose. Dans un organisme adulte la plupart des cellules sont dans cet état quiescent. Les cellules peuvent sortir sous certaines conditions de cet état de quiescence pour poursuivre leur cycle cellulaire jusqu'à la division.

2.3.2 Blocage réversible du cycle cellulaire

Le traitement des cellules avec des rayonnements ionisants peut provoquer des retards dans la progression du cycle cellulaire. Ces retards peuvent intervenir sur chacune des phases du cycle, à savoir G₁, S et G₂/M (KASTAN et BARTEK 2004). Cela se produit en conséquence aux dommages à l'ADN qui activent des points de contrôle spécifiques selon la phase du cycle dans laquelle la cellule se trouve quand les dommages se produisent. De manière générale, il est décrit que ces points de contrôle permettent aux cellules d'avoir du temps pour réparer correctement les dommages à l'ADN, ou encore de provoquer la mort de la cellule si besoin. Ainsi grâce à ces mécanismes, la cellule prévient de certaines mutations qui pourraient survenir dans le cas où les dommages sont peu ou mal réparés. L'expression des protéines qui constituent ces points de contrôle pourraient déterminer le degré de radiosensibilité des cellules.

Toute progression dans le cycle cellulaire, que ce soit en phase G₁, S, G₂ ou M est régulée par les cyclin-dependent kinases (CDKs). Une CDK est active seulement si elle est associée à une cycline. Il existe ainsi différents complexes cycline-CDK selon la position dans le cycle cellulaire. Par exemple cyclinD-CDK4 est active en G₁ et cyclinB-CDK1 est active en mitose. L'arrêt dans le cycle cellulaire nécessite l'inhibition d'un ou plusieurs complexes cyclin-CDK, et ceci se produit de deux façons sous irradiation. La première consiste en l'activation de protéines qui inhibent directement les complexes cyclin-CDK, ce sont les cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). La seconde voie consiste

en une modulation de la phosphorylation de la CDK. Certaines CDKs seront actives sous leur forme phosphorylée ou inversement d'autres sous leur forme déphosphorylée.

Arrêt en G1

Les cellules ont un point de contrôle avant le passage en phase S, à la transition G1/S. Ce point de contrôle est très important puisqu'il permet d'initier ou non la réplication de l'ADN. La transition de la phase G1 à la phase S est commandée par l'activation du facteur de transcription E2F. Ce facteur est important pour la régulation de nombreux gènes nécessaires à la réplication de l'ADN en phase S. E2F est maintenu inactif en phase G1 par liaison avec la protéine Rb. L'interaction Rb/E2F dépend du niveau de phosphorylation de Rb. Lorsque Rb est phosphorylée, l'interaction n'est pas possible. La phosphorylation de Rb est assurée par les cyclines D-CDK4 et E-CDK2 qui elles-mêmes sont contrôlées par p16 et p21. Donc lorsque p16 et/ou p21 sont exprimées, Rb n'est pas phosphorylée, E2F est inhibé et la transition G1-S bloquée. (KASTAN et BARTEK 2004)

Après irradiation l'arrêt en G1 par voie lente est initié par l'activation de la kinase ATM, qui induit la phosphorylation de p53 et inhibe sa protéolyse. L'élévation du niveau de p53 active le gène codant pour p21. Ainsi l'accumulation de p21 conduit à l'inhibition des CyclinD1-CDK4 et CyclinE-CDK2 qui permettent normalement la progression de la phase G1 vers la phase S.

Après irradiation, l'arrêt en G1 par voie rapide est sous le contrôle du complexe APC/C et aboutit à la dégradation protéolytique de cyclinD1. Cette réaction produit un relargage de p21 du complexe CyclinD1-CDK4, le rendant disponible pour l'inhibition des complexes de CDK2.

Les deux effets se conjuguent pour bloquer la progression de la phase G1.

Arrêt en S

Les points de contrôle restants (S et G2/M) sont régulés de la même façon, à savoir ils sont dépendants de deux protéines fortement apparentées appelées Chk1 et Chk2 (KASTAN et BARTEK 2004). Chk1 et Chk2 sont activées par

phosphorylation et sont des cibles directes pour ATR et ATM, respectivement. Les cellules qui sont irradiées en phase S montrent une diminution du taux de synthèse d'ADN, avec pour conséquence une augmentation du temps pour dupliquer leur ADN entier. La progression des cellules en phases S est régulée par la forme active déphosphorylée de la kinase CDK2. La déphosphorylation de cette kinase est maintenue par les phosphatases CDC25A et CDC25C. Quand Chk1 et Chk2 sont activées cela conduit à la phosphorylation de CDC25A et CDC25C et à la destruction ou inactivation de ces dernières. Le résultat étant une augmentation de la quantité de CDK2 phosphorylé et un ralentissement de la progression dans la phase S. Bien que l'activation de ATM-Chk2 et ATR-Chk1 suivie de l'inhibition de CDC25A et CDC25C soit le principal mécanisme impliqué dans la régulation de la phase S, d'autres protéines peuvent influencer la réponse en phase S.

Par exemple l'activation de PARP-1, induite par la détection des CSBs, permet une inhibition immédiate mais transitoire de la topoisomérase I (TopoI) et des histones par poly(ADP-ribosylation).

A plus long terme, l'activation d'ATM stimule la transcription de p21 via la stabilisation de p53, et celle de GADD45 via l'activation de l'oncogène BRCA1. La synthèse de p27 peut être également stimulée dans certaines lignées cellulaires. Ainsi GADD45 et dans une moindre mesure p21 et p27 sont capables d'inactiver PCNA, un élément essentiel des fourches de réplication. P21 inhibe également l'activité du complexe CycA-CDK2

Arrêt en G2/M

Il y a deux points de contrôle supplémentaires en G2. Les deux fonctionnent sur le même principe que le point de contrôle en S.

Le premier point de contrôle est ATM-Chk2-CDC25A/C dépendant. Ce point de contrôle est activé par des doses de rayonnement relativement faibles (1 Gy). La cible du complexe ATM-Chk2-CDC25A/C est dans ce cas le complexe mitotique cyclinB-CDK1, qui comme pour la phase S doit être déphosphorylé pour être actif. Ce premier point de contrôle intervient rapidement dans les cellules irradiées en phase G2 pour bloquer l'entrée en mitose.

Le deuxième point de contrôle décrit quant à lui le retard observé dans la phase G2 après irradiation de cellules lors des phases G1 et S. Ces cellules irradiées poursuivent leur cycle cellulaire mais quand elles arrivent en phase G2, elles s'arrêtent avant l'entrée en mitose. Le temps d'arrêt en G2 dans ces conditions est très dépendant de la dose et peut s'étaler sur plusieurs heures pour des cellules irradiées à forte dose. De plus ici ce point de contrôle n'est pas dépendant d'ATM. Le principal mécanisme implique le complexe ATR-Chk1-CDC25A/C. Ainsi même si le fonctionnement est similaire, il semblerait que le type de dommages persistants qui activent cette voie soit différent d'une CDB par exemple, mais suffisant pour activer ATR.

En conclusion, on admet généralement que les arrêts de la progression dans le cycle permettent aux mécanismes de réparation de fonctionner pour prévenir les anomalies de répllication (transition G1/S) ou les aberrations chromosomiques avant le passage en mitose (transition G2/M). L'existence d'une synthèse réparatrice en phase G2 a été démontrée (KAO, MCKENNA et YEN 2001). Concernant l'arrêt en phase S, des données suggèrent qu'un ralentissement de celle-ci est favorable à la réparation, avec réduction du taux d'abberations chromosomiques (KAWATA et al. 2004). En ce qui concerne l'arrêt en G1 il faut distinguer l'arrêt provisoire de l'arrêt permanent qui évolue vers un état de sénescence que nous allons détailler ci-après.

2.3.3 Blocage irréversible du cycle cellulaire

La sénescence cellulaire, pour la première fois décrite par L. Hayflick et P. Moorhead en 1961 (HAYFLICK 1965), décrit la limitation de la capacité proliférative des fibroblastes in-vitro. Les cellules normales quand elles sont cultivées in vitro se divisent jusqu'à un certain nombre de fois avant d'entrer dans une phase d'arrêt du cycle cellulaire qui s'accompagne de changements morphologiques et moléculaires complexes. Ainsi les caractéristiques principales qui permettent d'identifier les cellules sénescents sont un arrêt dans le cycle cellulaire, une augmentation du volume global, l'augmentation de l'activité SA- β -Galactosidase,

l'augmentation de l'activité autophagique, l'apparition d'un sécrétome spécifique et la résistance à l'apoptose. Les cellules sénescents sont arrêtées dans le cycle cellulaire, principalement en phase G1. Cet arrêt résulte de l'activation des voies p53-p21 et p16INKA-Rb qui peuvent agir en parallèle ou de façon interconnectée. La voie p53/p21 est induite en réponse à différents dommages à l'ADN associés à la sénescence, notamment le raccourcissement télomérique. Les mécanismes qui activent la voie p16INKA-Rb lors de la sénescence ne sont pas totalement élucidés, mais des études ont montré que cette voie est cruciale à l'arrêt dans le cycle des cellules épithéliales (cellules mammaires et kératinocytes) (BEN-PORATH et R. A. WEINBERG 2005 ; NASSOUR et al. 2016). Des marqueurs de sénescence ont été identifiés *in vitro*. Le plus utilisé et le plus universel est la senescence-associated β -Galactosidase activity (SA- β -Gal). Cette enzyme lysosomale possède une activité optimale à pH4 qui peut être détectée à un pH6 non optimal dans les cellules sénescents du fait de l'augmentation de la charge lysosomale à la sénescence (B. Y. LEE et al. 2006). p16INK4A est également souvent utilisé comme marqueur de sénescence (RESSLER et al. 2006). La détection de ces marqueurs dans des échantillons de peau âgée a permis la mise en évidence de l'accumulation de cellules sénescents *in vivo* (DIMRI et al. 1995 ;B. Y. LEE et al. 2006 ;RESSLER et al. 2006 ;NASSOUR et al. 2016). Un des mécanismes inducteur de sénescence le mieux décrit est le raccourcissement des télomères au cours de la réplication. Les télomères sont les structures terminales des chromosomes, constituées par la séquence -TTAGGG- répétée, adoptant une structure en boucle masquant les extrémités chromosomiques. A chaque cycle de division, les télomères se raccourcissent à cause de l'incapacité de l'ADN polymérase à répliquer l'extrémité du brin retardé. Ainsi, après un certain nombre de doublements, les télomères devenus trop courts perdent leur organisation en boucle, les extrémités chromosomiques sont alors reconnues comme des CDB, ce qui initie la voie DDR et l'arrêt dans le cycle cellulaire via la voie p53/p21 caractéristique de l'état sénescents. De plus, en l'absence de certains points de contrôle du cycle, les télomères raccourcis peuvent être à l'origine de fusions chromosomiques end-to-end génératrices d'instabilité chromosomique et de transformation (Blackburn, 2001 ; d'Adda di Fagagna et al., 2003 ; Deng et al., 2008)(BLACKBURN 2001 ;DENG, CHAN et CHANG 2008 ;FAGAGNA et al. 2003).

La sénescence peut cependant aussi être induite prématurément en réponse à différentes situations de stress telles que les radiations ionisantes, les radiations UV (TOUSSAINT et al. 2000), l'application de certaines drogues chimiothérapeutiques (COLLADO et SERRANO 2010) ou l'activation de certains oncogènes comme Ras (A. C. LEE et al. 1999) ou NF- κ B (BERNARD et al. 2004). Le dénominateur commun de toutes ces situations est le stress oxydant résultant d'une surproduction de ROS. Il existe plusieurs types de ROS dont l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$), le radical hydroxyle (OH°), et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les anions superoxydes sont très réactifs, mais, de par leur charge, leur diffusion dans la cellule est limitée. H_2O_2 au contraire diffuse dans la cellule comme l'eau, soit directement à travers les membranes, soit en empruntant des aquaporines (BIERNERT, SCHJOERRING et JAHN 2006). OH° est le plus réactif des ROS. Il est généré principalement à partir de H_2O_2 , en présence de Fe^{++} par la réaction de Fenton (HENLE et LINN 1997). La cellule possède différents systèmes de protection contre ces ROS, notamment des enzymes antioxydantes. Ainsi le taux des anions superoxydes est régulé par des métalloenzymes, les superoxydes dismutases (SOD), qui catalysent leur dismutation en H_2O_2 . Ce dernier peut être dégradé par la catalase (CAT) et par plusieurs types de peroxydase qui accélèrent sa transformation en H_2O . Il n'existe aucune enzyme permettant de dégrader OH° (KLAUNIG et KAMENDULIS 2004).

A la sénescence, les taux élevés de ROS sont susceptibles d'entraîner des altérations structurales et fonctionnelles des macromolécules et des organites de la cellule. Une des cibles majeures est la molécule d'ADN. En effet, OH° est abondamment généré dans le noyau de par sa richesse en Fe^{++} (HENLE et LINN 1997). L'attaque oxydante de l'ADN peut avoir lieu au niveau de la liaison sucre-phosphate ainsi qu'au niveau de la base. L'oxydation de la liaison sucre-phosphate aboutit à des cassures simple-brin et, à moindre fréquence (trois fois moins), à des cassures double-brin. Ces deux types de cassures peuvent générer respectivement des mutations ponctuelles et de l'instabilité génomique (CALDECOTT 2008). Parmi les bases, la plus sensible aux attaques oxydantes est la guanine qui génère des 8-hydroxy-guanines. Celles-ci peuvent être mésappariées avec des adénines, ce qui est donc générateur de mutations ponctuelles (TUDEK 2007). De plus, il peut y avoir génération de cassures simple-brin lors de leur

réparation par BER (CALDECOTT 2008).

Comme cela est le cas pour la sénescence répliquative, les cellules qui subissent une sénescence induite par l'irradiation ne sont pas "métaboliquement mortes". Cependant comme elles ne peuvent plus proliférer, elles sont incapables de contribuer à la récupération des tissus ou des tumeurs. La partie la mieux comprise de l'induction de sénescence après radiothérapie implique l'activation de voies inhibitrices du cycle cellulaire telles que celles mises en jeu par le système DDR. Dans certains types cellulaires, l'activation du "checkpoint" en G1, induit par p53 et/ou p21, peut conduire à un arrêt permanent en G1/G0 suite à l'activation de la CDKI-p16 et de Rb. De la même façon que l'apoptose, la propension des cellules à devenir sénescence consécutivement à l'irradiation dépend du type cellulaire et du type de la tumeur.

Ainsi la sénescence prématurée et répliquative, agit comme un obstacle au développement du cancer. D'ailleurs, les voies qui contrôlent ce processus sont souvent altérées dans le cancer. Cependant les voies qui contrôlent la sénescence répliquative et la sénescence prématurée sont au moins en partie distinctes. En effet certaines cellules tumorales peuvent entrer en sénescence prématurée suite à l'irradiation, alors que l'on sait clairement que les cellules tumorales ont des mécanismes qui empêchent l'entrée en sénescence répliquative. Néanmoins, les deux voies partagent des caractéristiques communes qui peuvent être altérées au cours de la carcinogenèse. Au final il y a une grande variation dans la possibilité d'induire la sénescence dans les tissus tumoraux après irradiation, et ceci est fonction des modifications génétiques propres au cancer de l'individu. Pour les tissus sains cette variation est également importante en fonction du type cellulaire.

2.4 Induction de mort cellulaire par les cassures de l'ADN radio-induites

Le succès du traitement d'un cancer par radiothérapie résulte dans la capacité de celui-ci à provoquer la mort des cellules qui composent la tumeur. Comme nous avons vu précédemment les conséquences biologiques de l'irradiation, y

compris la mort cellulaire, sont le plus souvent consécutives à l'activation de la voie DDR. En effet le système de réponse aux dommages à l'ADN détermine non seulement la sensibilité de la cellule à mourir, mais aussi le type de mort et aussi le moment de survenue de celle-ci. Il est important de définir ce que l'on entend par mort cellulaire dans le contexte de la radiothérapie et du traitement du cancer par radiothérapie. En effet, pendant de nombreuses années et ceci probablement en raison d'un manque de connaissance, peu d'attention a été accordée aux différents mécanismes et types de mort survenant dans les cellules en réponse aux radiations ionisantes ou aux autres traitements du cancer. Aussi la quantification de la mortalité est difficile dans la mesure où les cellules meurent à différents moments après l'irradiation et même après plusieurs cycles cellulaires. C'est ainsi que les spécialistes ont mis l'accent sur l'évaluation de la survie clonogénique, qui est définie comme étant la capacité d'une cellule à proliférer indéfiniment après l'irradiation. Cette mesure est très robuste et pertinente pour évaluer l'efficacité du traitement par radiothérapie à empêcher la prolifération cellulaire et donc à contrôler la tumeur. Par conséquent une cellule morte dans le contexte de la radiobiologie est une cellule qui perd toute capacité à proliférer. Bien sûr pour les cellules différenciées (comme les cellules nerveuses et musculaires par exemple) qui ne sont pas dans un processus de prolifération, il est plus pertinent de considérer les différents types de mort cellulaire et d'évaluer comment le rayonnement ionisant altère leur fonction. De plus, dans ce cadre, la sénescence est considérée comme un mécanisme de mort, ce qui génère une ambiguïté voire des erreurs de raisonnement et d'interprétation, car les cellules sénescents ne sont pas mortes, mais seulement arrêtées dans le cycle cellulaire de façon permanente.

Il est maintenant clairement connu que les cellules peuvent mourir par différents mécanismes en réponse aux irradiations. Les scientifiques ont porté une attention accrue aux mécanismes de mort cellulaire depuis la découverte d'une forme génétiquement programmée de mort cellulaire connu sous le terme d'apoptose. Cette mort cellulaire est considérée comme étant un choix de la cellule en réponse aux dommages, au stress ou comme barrière à la tumorigenèse. L'apoptose peut être activée par la voie DDR et est donc déterminante dans la réponse cellulaire aux irradiations. Depuis la découverte de l'apoptose, plusieurs

autres voies de mortalité cellulaire sous contrôle génétique ont été découvertes. Il s'agit par exemple de l'autophagie et de la nécrose. Il est important de noter que ces voies de mort cellulaire sont différemment activées selon le type de tissu et qu'elles sont souvent altérées dans les cancers.

2.4.1 Apoptose

L'apoptose est une forme de mortalité cellulaire hautement régulée. L'apoptose peut être initiée soit par une suite de signaux se produisant dans la cellule elle-même (comme celles après une activation de la voie DDR), ou soit par des signaux venant de l'extérieur de la cellule, par exemple venant du tissu environnant ou des cellules du système immunitaire (TAYLOR, CULLEN et MARTIN 2008). L'apoptose fait partie des processus essentiels et normaux de beaucoup de situations physiologiques incluant le développement embryonnaire, la réponse immunitaire, et le maintien de l'homéostasie tissulaire. En conséquence, une altération du contrôle de l'apoptose contribue à un nombre important de maladies, incluant le cancer. L'apoptose est à la fois morphologiquement et moléculairement distincte des autres formes de mortalité cellulaire. Morphologiquement, la mort par apoptose se caractérise par un bourgeonnement de la membrane, ainsi qu'une condensation et une digestion de l'ADN en petits fragments. Durant ce processus, le contenu de la cellule est aussi fragmenté en de nombreux corps apoptotiques, qui in vivo sont éliminés par les phagocytes. Les participants moléculaires dans la voie de l'apoptose peuvent être divisés en deux groupes : les senseurs et les effecteurs. Les molécules senseurs initient la voie de l'apoptose et ce sont les effecteurs qui exécutent l'apoptose.

La mort cellulaire apoptotique est caractérisée par l'activation séquentielle de différentes enzymes connues sous le nom de Caspases. Ces différentes protéines sont initialement exprimées sous une forme inactive : ce sont les Procaspases. De plus elles sont tenues dans cette forme inactive par les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP). L'apoptose commence suite à l'activation d'une caspase senseur telle que la caspase 8 ou 9. Ces caspases activent ensuite un ensemble commun d'autres caspases effectrices (par exemple les caspases 3, 6 et 7), qui viennent cliver un grand nombre de protéines cellulaires conduisant ainsi à la destruction

finale de la cellule.

L'apoptose qui est initiée par la caspase 8 est appelé voie "extrinsèque", car elle est normalement activée lors de la liaison d'un ligand extra-cellulaire à un récepteur spécifique présent sur la membrane cellulaire. Des exemples de ces ligands sont le facteur TNF (tumor necrosis factor), le facteur TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), et le facteur FASL qui se lient respectivement aux récepteurs TNFR, TRAILR et FAS. Cette voie extrinsèque de l'apoptose n'est pas connue pour être induite par les radiations, mais elle reste une cible pour combiner de nouveaux médicaments avec les radiations. ERIKSSON et STIGBRAND 2010

L'apoptose qui est initiée par la caspase 9 est appelée voie "intrinsèque" puisqu'elle est activée dans la cellule en réponse à diverses formes de dommages cellulaires, dont les dommages à l'ADN. L'activation de la caspase 9 est contrôlée dans une large mesure par la balance entre protéines pro et anti-apoptotiques qui se trouvent dans ou près des mitochondries. Dans des conditions normales de vie cellulaire, la balance est en faveur des facteurs anti-apoptotiques tels que BCL2 et l'activation de la caspase 9 est empêchée. Les conditions qui modifient cet équilibre conduisent à la libération de cytochrome C et d'autres molécules de la mitochondrie dans le cytoplasme entraînant la formation d'une structure appelée apoptosome au sein duquel la caspase 9 sera activée. Après irradiation, l'équilibre peut être basculé en faveur de l'apoptose en raison, en partie, de l'activation de p53 et de l'induction de protéines pro-apoptotiques telles que BAX et PUMA. ERIKSSON et STIGBRAND 2010

L'activation de l'apoptose est fortement dépendante de l'équilibre des protéines pro et anti-apoptotiques. Cet équilibre varie considérablement d'un type de cellule à un autre et d'une tumeur à une autre. Ceci explique pourquoi l'irradiation provoque de l'apoptose seulement dans certains tissus normaux, bien que p53 soit activé en réponse aux dommages à l'ADN, dans presque tous les types de tissus normaux. Par exemple, les fibroblastes ne meurent presque jamais par apoptose en dépit de la démonstration de l'activation de p53 et BAX. Dans ces cellules, l'induction de BAX ne suffit pas à initier la libération du cytochrome C et donc l'activation de la caspase 9. Ces cellules peuvent avoir une plus grande proportion de molécules anti-apoptotiques telles que BCL2, ou elles peuvent

avoir des niveaux plus élevés des protéines IAP, qui bloquent l'activation des caspases. Par conséquent, l'apoptose joue peu ou pas de rôle dans la radiosensibilité de ces types de cellules. En revanche d'autres cellules normales, telles que les lymphocytes et les thymocytes peuvent facilement subir l'apoptose après irradiation. Dans ces cellules, l'activation de p53 et la production de BAX suffisent à provoquer la libération du cytochrome C par les mitochondries et à induire l'apoptose. ERIKSSON et STIGBRAND 2010

Dans les tumeurs, un grand nombre de gènes qui régulent l'apoptose sont souvent altérés. Par exemple, beaucoup de tumeurs présentent une perte de la fonction du gène p53 et les cellules sont donc incapables d'initier l'apoptose par cette voie. L'apoptose est un moyen de défense important contre le développement du cancer, et la perte de cette fonction est reconnue comme étant une caractéristique essentielle du cancer. SCHNARR et al. 2009 Ainsi la facilité ou non d'induire l'apoptose dans les cellules est un facteur déterminant le degré de radiosensibilité. Cependant ceci est plus ou moins vrai selon la contribution des autres types de morts cellulaires.

2.4.2 Autophagie

Autophagie est un terme qui signifie littéralement "se manger soi-même". Ce terme décrit un procédé durant lequel la cellule digère une partie de ses propres composants. Les bases moléculaires de l'autophagie et les relations avec les mécanismes de survie cellulaire est un champ actif de la recherche qui vient d'ailleurs de faire l'objet du prix Nobel de physiologie et de Médecine 2016. L'autophagie est contrôlée par plus de 20 produits de gènes connus, ce sont les protéines Atg. Ces protéines initient la formation d'une double membrane qui se développe et englutit les composants à éliminer formant ainsi des vacuoles appelées autophagosomes (KLIONSKY et al. 2008). Ces autophagosomes fusionnent avec les lysosomes pour initier la dégradation des composants cytoplasmiques, et ainsi fournir des métabolites et des macromolécules.

L'autophagie est activée en réponse à différentes situations, par exemple en réponse à une privation en nutriments. Ce procédé est régulé par mTOR (mammalian target of rapamycin), qui est un senseur général des éléments nutritifs de

la cellule comme les niveaux d'énergie. Dans cette situation, l'autophagie permet de favoriser la survie globale pendant les périodes de privation en éléments nutritifs, en provoquant la digestion limitée des éléments du cytoplasme et donc en soutenant les processus métaboliques.

L'autophagie a été observée après de nombreux traitements anti-cancéreux, incluant les rayonnements ionisants, ce qui suggère qu'elle pourrait être un élément important dans le mécanisme de destruction de ces cellules par ces agents (RUBINSZTEIN et al. 2007). Cependant il n'est pas encore clair que l'autophagie observée représente une tentative pour la cellule de survivre, ou si réellement il s'agit bien d'une forme de mort cellulaire programmée.

Il semble également y avoir un certain antagonisme entre l'autophagie et l'apoptose, puisque l'autophagie est plus facilement observée dans les cellules qui présentent un défaut dans l'apoptose. En conséquence, de manière similaire à ce qui a été discuté pour l'apoptose, la contribution de l'autophagie à la mort cellulaire radio-induite a toute son importance.

2.4.3 Nécrose

On peut dire que si l'apoptose représente "la mort par suicide", alors la nécrose représente "la mort par blessure". La nécrose a toujours été considérée comme une mort inappropriée ou accidentelle qui se produit dans des conditions extrêmement défavorables, telles que celles qui sont incompatibles avec des processus physiologiques normaux. Des exemples de conditions qui peuvent activer la nécrose comprennent des changements extrêmes de pH, des pertes d'énergie, ou encore des déséquilibres ioniques. Par conséquent, la nécrose est généralement considérée comme une mort cellulaire irréversible et chaotique. La mort par nécrose se caractérise par un "gonflement" cellulaire, la déformation de la membrane, la rupture des organites, ainsi que la libération d'enzymes lysosomales qui attaquent la cellule. Ces conditions peuvent se produire après une infection, une inflammation ou encore après une ischémie.

Cependant, il a été montré que la nécrose est un processus régulé qui peut être modulé. Par exemple, l'induction de la nécrose semble être dépendante des stocks de NAD⁺ et d'ATP. Elle est vraisemblablement amorcée par une hyper-

activation de PARP-1 (SCHRAUFSTATTER et al. 1986), en effet la reconnaissance des CSB par PARP-1 induit son activation et aboutit à l'élongation de polymères d'ADP-ribose au dépens de NAD⁺ (MURCIA et MÉNISSIER DE MURCIA 1994). Une synthèse massive de polymères conduit à l'épuisement rapide du pool de NAD⁺, à l'effondrement de la chaîne respiratoire mitochondriale, à l'effondrement du taux d'ATP et à une mort cellulaire rapide. Les types cellulaires aptes à développer le syndrome de nécrose sont ceux dans lesquels l'expression de PARP-1 est constitutivement élevée (cellules épithéliales, endothéliales, myocytes, fibroblastes).

La nécrose cependant est aussi observée dans les tumeurs et peut être induite par un traitement anti-cancéreux ou encore par les radiations ionisantes. Autrefois confondue avec l'apoptose, la nécrose survient quelques minutes à quelques heures après une forte dose de rayonnement (dizaine de Gray). Bien qu'on ne sache pas encore très bien comment l'irradiation induit la nécrose, la fréquence à laquelle on observe celle-ci peut varier selon le type cellulaire. En outre il a été montré que le stress cellulaire (comme le stress oxydant), les variations des taux de calcium et l'activation de p53 influencent la perméabilité des membranes lysosomales. Cette perméabilisation intracellulaire conduit à l'acidification de la cellule et à la libération de certaines enzymes, qui peuvent favoriser la nécrose.

2.4.4 Mort mitotique et mort différée

La catastrophe mitotique est un terme qui a évolué au fil de ces dernières années pour englober l'ensemble des phénomènes de mort cellulaire consécutif à une mitose aberrante. Morphologiquement, la catastrophe mitotique est associée à l'accumulation de cellules multinucléées et géantes contenant des chromosomes non-condensé, mais aussi de cellules contenant des aberrations chromosomiques et des micro-noyaux. Ce processus se met en place dans les cellules dont la mitose ne se déroule pas normalement, en général à cause de dommages à l'ADN non-réparés ou mal réparés.

La catastrophe mitotique est fréquente dans les cellules après irradiation. En effet ces dernières ont souvent une multitudes d'aberrations chromosomiques quand elles entrent en mitose. La mort par catastrophe mitotique se caractérise

par une perte de la capacité répliquative, et peut se produire quand il y a une incapacité physique à répliquer et séparer le matériel génétique correctement, ou encore quand il y a une perte du matériel génétique lors du processus. En plus d'agir en tant que mécanisme propre de mort cellulaire, la catastrophe mitotique peut aussi servir comme déclencheur des autres types de mort. Ainsi la catastrophe mitotique qui résulte de cellules fusionnées, polyploïde, ou encore par défaut dans le processus de cytokinèse, peut par suite conduire à la mort cellulaire par apoptose, sénescence, autophagie ou encore nécrose. Dans ce dernier cas, la tentative de mitose ratée conduit à l'activation d'un programme de mort indépendamment du type de dommages à l'ADN qui était présent au départ (Chu et al, 2004). Autrement dit, la distinction importante est que la mort cellulaire est provoquée par la catastrophe mitotique plutôt que comme une réponse cellulaire aux dommages à l'ADN induit initialement par les rayonnements ionisants.

Il existe plusieurs points de contrôle pendant la phase G2 et tout au long de la mitose pour éviter la catastrophe mitotique. Les cellules qui montrent des défauts dans l'activation des points de contrôle peuvent entrer en mitose de manière anormale et mourir par catastrophe mitotique. Par exemple, l'échec pour empêcher l'entrée en mitose est en grande partie responsable de la radiosensibilité accrue des cellules ATM déficiente. Un grand nombre de gènes impliqués dans la voie DDR, et dans les points de contrôle sont altérés dans le cancer et par conséquent, la propension des cellules à subir une catastrophe mitotique peut varier considérablement entre les différentes tumeurs.

Les aberrations chromosomiques les plus graves conduisent à une mort rapide et ne sont donc pas transmises à la descendance. C'est pourquoi le taux de réarrangements complexes et de chromosomes dicentriques décroît à l'issue de chaque mitose post-irradiation, respectivement de 30% et 50%. Les lésions les plus bénignes (translocations, inversions, courtes délétions) sont compatibles avec un taux de survie élevé et échappent à l'élimination opérée par la mort cellulaire. Elles peuvent ainsi donner lieu dans les cellules survivantes à une instabilité dite génomique ou chromosomique. Ils existent aujourd'hui des méthodes pointues pour mesurer le taux d'aberrations chromosomiques (M'KACHER et al. 2015). Cette instabilité se manifeste par l'apparition de clones présentant

des anomalies caryotypiques évoluant au fil des générations après l'exposition au rayonnement. Ces clones présentent un faible potentiel clonogène, et conduisent à l'apparition de microcolonies. C'est ce qui a été nommé mort différée, de façon assez ambiguë car ces cellules ne meurent pas, mais seulement prolifèrent moins et pourraient donc donner origine à des seconds cancers.

Étude expérimentale du rôle de la sénescence et des cassures simple-brin de l'ADN : Un lien possible avec les sarcomes secondaires en territoire irradié

3.1 Seconds cancers radio-induits

Pour éradiquer le cancer, il est courant en radiothérapie de délivrer une forte dose d'irradiation à la tumeur. En raison de la construction du PTV et donc des marges prises pour englober l'ensemble de la tumeur, un certain nombre de cellules normales en bordure du PTV reçoivent de la dose lors du traitement radio-thérapeutique (Voir figure 3.1). Cette dose même faible peut induire dans les cellules normales des mutations. Si certaines des cellules mutées survivent elles peuvent être à l'origine d'un second cancer. Par conséquent il existe un faible risque de produire un second cancer après un traitement primaire par irradiation. La question des seconds cancers en territoire irradié est de plus en plus reconnue, en effet l'amélioration des techniques de radiothérapie ainsi que des traitements du cancer augmente considérablement les chances de survie à long terme des

patients et donc dans le même temps la possibilité pour ces seconds cancers de se développer. Ainsi d'après l' "US National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program", les seconds cancers ou cancers d'ordre supérieur initiés par un traitement primaire de radiothérapie pourraient concerner aujourd'hui 1 patient sur 6.

Ainsi le traitement des cancers par radiothérapie peut induire dans quelques cas, généralement quelques années après le traitement primaires, des tumeurs secondaires. Ces tumeurs secondaires apparaissent préférentiellement en bordure du champ traité, dans une zone où les radiations sont faibles et non létales. Les tumeurs secondaires radio-induites peuvent être des carcinomes (donc issus de cellules épithéliales), mais le plus souvent ce sont des sarcomes. Nous allons voir ci-après les caractéristiques essentielles de ces sarcomes secondaires.

3.2 Caractéristiques des sarcomes en territoire irradié

Les sarcomes secondaires sont des cancers fréquents en territoire irradiée et ils posent un réel problème car ils ont des pronostics très défavorables. Nous allons voir ci après les caractéristiques générales de ceux-ci (VAUTRAVERS et al. 2010).

Définition

Même si on ne peut jamais prouver clairement qu'un second sarcome est consécutif à une radiothérapie, on s'accorde sur le fait que la probabilité d'en développer un augmente avec celle-ci. Les critères généralement reconnus pour définir les sarcomes radio-induits ont été d'abord proposés par CAHAN et WOODARD 1948, ensuite modifiés par ARLEN et al. 1971. Ces critères sont les suivants :

- Un traitement irradiant à des doses thérapeutiques précédant le développement du sarcome
- Une lésion développée au sein du ou des champs d'irradiation
- Une histologie différente entre la tumeur primitive irradiée et la lésion sarcomateuse



FIGURE 3.1 – Exemple de dosimétrie en radiothérapie 3D. Ici le PTV est traité à l'aide de 4 faisceaux d'irradiation ce qui est standard en radiothérapie conformationnelle 3D. Nous pouvons visualiser les différentes régions caractéristiques avec le maximum de dose reçue dans le PTV (en violet 100 % de dose), la région de bordure proche (vert 80 % de dose) et la région de bordure plus lointaine (bleu moins de 50 % de dose). Ainsi nous pouvons visualiser le fait qu'un nombre important de cellules normales reçoivent de la dose. :

Type histologique

Les sarcomes en territoire irradié sont majoritairement de grade élevé et souvent peu différenciés (BRADY, GAYNOR et BRENNAN 1992 ; BARBARA et IRA 1998 ; LAGRANGE et al. 2000 ; PENEL et al. 2008 ; ROBINSON, NEUGUT et WYLIE 1988). Dans la littérature, les ostéosarcomes sont les plus fréquents, suivis par les fibrosarcomes et les histiocytomes fibreux malins (J. H. KIM et al. 1978). Dans des séries de patients plus récentes, l'histiocytome fibreux malin était le plus fréquent suivi de l'ostéosarcome (BARBARA et IRA 1998). Il n'est pas possible de déterminer grâce à l'examen anatomo-pathologique si un sarcome développé dans un volume irradié est radio-induit ou de novo. Cependant, il semble y avoir quelques différences dans la morphologie des tissus adjacents (LASKIN, SILVERMAN et ENZINGER 1988).

Caractéristiques moléculaires

Concernant les caractéristiques moléculaires, une étude a montré que les sarcomes induits par la radiothérapie présentent un transcriptome spécifique par rapport aux sarcomes sporadiques non radio-induits. En effet il a été montré que ces sarcomes en territoire irradiée régulent spécifiquement 135 gènes (63 de ses gènes présentent une "downregulation" et 72 une "upregulation") par rapport aux sarcomes sporadiques non radio-induits. Une grande partie de ces gènes est impliquée dans la régulation du stress oxydant. Ainsi cette signature transcriptomique des sarcomes radio-induits suggère une implication forte du stress oxydant chronique dans la survenue de ceux-ci (HADJ-HAMOU et al. 2011).

Facteurs pronostiques

Le pronostic est très défavorable, avec un taux de survie global à cinq ans de 10 à 30 % (LAGRANGE et al. 2000 ; MARK, POEN et al. 1994 ; PITCHER et al. 1994). La durée médiane de survie était de 12 à 24 mois dans les séries les plus récentes (MURRAY et al. 1999 ; LAGRANGE et al. 2000). Ce pronostic défavorable semble lié à des facteurs tels que le grade, la taille, la localisation tumorale et la difficulté de mise en oeuvre du traitement chirurgical (BRADY, GAYNOR et BRENNAN 1992).

Fréquence, incidence

Généralement, les données sur l'épidémiologie des sarcomes des tissus mous sont peu nombreuses (LAHAT, LAZAR et LEV 2008). Le taux de prévalence des sarcomes en territoire irradié est faible, de l'ordre de 0.14 à 0.20 % (JACOBSEN et al. 1993; KARLSSON, HOLMBERG, JOHANSSON et al. 1996). Par ailleurs le risque relatif (risque par rapport à une population non traitée par radiothérapie) de développer un sarcome en territoire irradié est de l'ordre de 1 à 5 (ARLEN et al. 1971; JACOBSEN et al. 1993; KARLSSON, HOLMBERG, JOHANSSON et al. 1996; KARLSSON, HOLMBERG, SAMUELSSON et al. 1998). L'incidence des SETI (Sarcomes en Territoire Irradié) semble être en augmentation. Huang et al ont montré chez les patients traités par radiothérapie une augmentation d'un facteur 16 des angiosarcomes (sarcomes prenant origine à partir des cellules endothéliales vasculaires) et une augmentation d'un facteur 2 des sarcomes de façon globale par rapport à une cohorte témoin.

Période de latence

Le délai entre l'irradiation et l'apparition de la lésion est le critère le plus sujet à discussion entre les experts. Trois ou quatre ans semble être le temps moyen de latence après une irradiation pour développer un sarcome en territoire irradié. L'analyse de la littérature met cependant en évidence des temps de développement allant de quelques mois à 50 ans (AMENDOLA et al. 1989; KUTEN et al. 1985; LASKIN, SILVERMAN et ENZINGER 1988; MARK, BAILET et al. 1993; MURRAY et al. 1999; MURRAY et al. 1999; RUKA et al. 1991; TAGHIAN et al. 1991). L'équipe médicale en charge des sarcomes au sein du Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC) considère qu'une période de latence de quelques mois est suffisante pour affirmer le diagnostic de SETI (19).

influence de la zone d'irradiation et de la dose associée

Pour décrire l'influence de la zone d'irradiation sur la survenue des cancers en territoire irradié, nous allons ici nous appuyer sur une étude épidémiologique de 115 patients atteints de cancers radio-induits. Il a été montré que 12 % des cancers radio-induits surviennent dans le PTV, 66 % dans la région de bordure

du PTV et enfin 5 % surviennent à plus de 5 cm du PTV. De plus cette étude nous donne des informations très intéressantes sur la dose totale reçue au site d'émergence du second cancer. En effet au site d'émergence du second cancer, tous les niveaux de doses allant de 0 à 75 Gy sont représentés, cependant notons que environ 30 % de ces cancers émergent dans une zone où la dose totale reçue était inférieure à 2.5 Gy (voir figure 3.2)(DIALLO et al. 2009).

3.3 Hypothèse sur les mécanismes d'induction des seconds sarcomes en territoire irradié et objectifs de l'étude

De nombreuses données ont amené à considérer la sénescence comme un mécanisme d'arrêt irréversible de prolifération que les cellules doivent contourner pour devenir tumorigène. Cependant, l'arrêt dans le cycle cellulaire associé à la sénescence n'est pas irréversible dans tous les types cellulaires, notamment dans les cellules épithéliales, le type cellulaire à l'origine des cancers les plus fréquents chez l'homme. En effet, il a été montré que les kératinocytes ou les cellules épithéliales mammaires humaines normales développent au plateau de sénescence toutes les caractéristiques de cellules sénescents, mais un petit nombre d'entre elles réactivent spontanément un processus mitotique qui génère des clones de cellules post-sénescents. Mon équipe d'accueil a montré que ces cellules post-sénescents sont mutées et transformées et capables de former des hyperplasies ou des petits carcinomes dans des essais de tumorigénèse chez la souris. Ils ont également montré que des dommages à l'ADN générés par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) accumulées à la sénescence seraient le moteur mutagène de cette émergence néoplasique post-sénescence (PSNE). Un des projets de mon équipe consiste à caractériser les dommages oxydants de l'ADN potentiellement impliqués. Pour ce faire ils se sont focalisés sur les dommages les plus mutagènes et générateurs d'instabilité génétique : les CSB et les CDB . Pour déterminer si ces cassures jouent un rôle dans la PSNE, il a été question de tirer partie de l'analyse comparée de deux types cellulaires qui diffèrent complètement quant à leur capacité à émerger de la sénescence : les fibroblastes

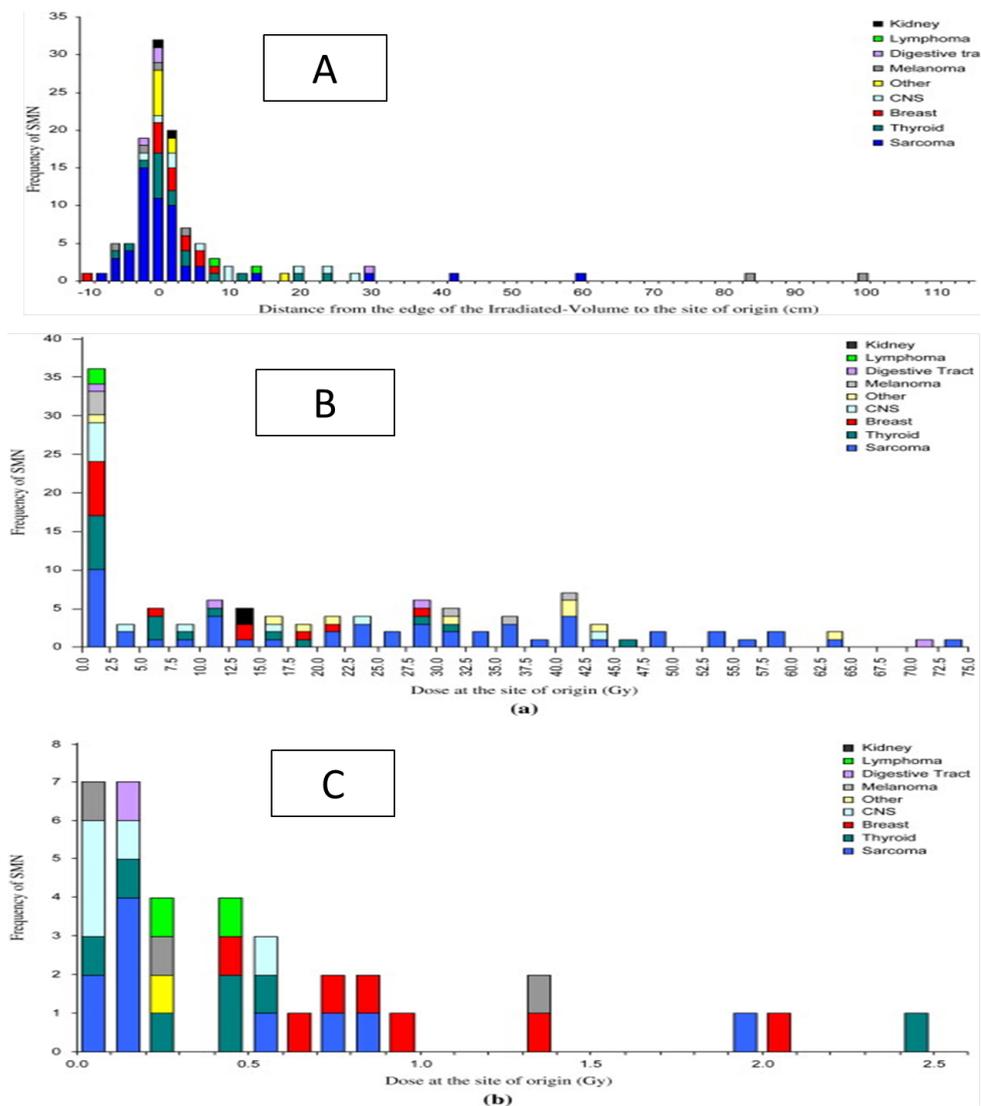


FIGURE 3.2 – Fréquence des cancers radio-induits en fonction de la dose et de la distance du PTV (DIALLO et al. 2009).

- Panel A : Fréquence d'incidence des cancers radio-induits selon la distance entre la bordure du volume irradié (PTV) et le site d'origine du second cancer
- Panel B : Fréquence d'incidence des cancers radio-induits selon la dose reçue au site d'origine du second cancer (de 0 à 75 Gy)
- Panel C : Fréquence d'incidence des cancers radio-induits selon la dose reçue au site d'origine du second cancer (Zoom de 0 à 2.5 Gy)

humains normaux de derme (NHDF) et les kératinocytes humains normaux d'épiderme (NHEK). Les NHEK entrent en sénescence après 15-20 doublements de population puis, soit meurent par autophagie, soit pour environ une cellule sur 10 000 développent une PSNE, spontanément et systématiquement quel que soit le donneur de cellules. Les NHDF quant à eux entrent en sénescence après 50-60 doublements de population, puis restent dans cet état stable pendant plusieurs mois, voire plusieurs années. Les données les plus récentes obtenues dans ce cadre indiquent que les deux types cellulaires présenteraient à la sénescence un ratio CSB/CDB très différent. Les NHDF accumulent à la sénescence les deux types de cassures, avec des CDB dominants et qui persistent sans être réparés, ce qui pourrait constituer un des mécanismes à la base de l'irréversibilité de l'arrêt du cycle cellulaire associé à la sénescence. Dans les NHEK au contraire, seuls des CSB s'accumulent à la sénescence. Elles persistent sans être réparées suite à un défaut d'expression de la PARP1. Les CDB sont rares dans les kératinocytes et ne s'accumulent pas à la sénescence, ce qui pourrait expliquer que certains kératinocytes sénescents soient capables de réentrer dans le cycle cellulaire et générer des cellules PSNE dans lesquelles des mutations auraient pu s'accumuler. Ils ont également montré que seuls les CSB proviennent d'une attaque oxydante. En effet, des traitements antioxydants font diminuer le taux de CSB sans affecter celui des CDB. L'origine de ces dernières nous est pour l'instant inconnue. De façon intéressante, les traitements antioxydants ont aussi pour effet de repousser la sénescence et inhiber la PSNE, ce qui suggère que les CSB, mais pas les CDB, pourraient jouer un rôle moteur dans la PSNE (NASSOUR et al. 2016).

Le projet sur lequel j'ai travaillé pendant ma thèse a pour objectif d'étudier les mécanismes à l'origine des sarcomes secondaires. L'hypothèse sur laquelle se base le travail est que des fibroblastes normaux de peau en bordure du champ d'irradiation pourraient subir des modifications qui les mettraient à risque pour la transformation. Le long délai observé avant l'apparition de ces sarcomes suggère que ces modifications mettraient les fibroblastes normaux dans un état de dormance, et nous proposons que cet état de dormance soit similaire à de la sénescence. Cet état de dormance/sénescence pourrait être plus proche de l'état de sénescence normale des NHEK que de celui des NHDF, ouvrant ainsi la possibilité qu'il soit suivi d'une émergence néoplasique similaire à la PSNE

que nous décrivons *in vitro*. Autrement dit, en termes de dommages à l'ADN, les fibroblastes de la bordure de champ pourraient subir suite au traitement radiothérapeutique un ratio CDB/CSB très différent de celui observé en plein champ.

Les principaux objectifs de mon projet de thèse dans cette partie biologie était donc

1- D'analyser les cassures simple-brin et cassures double-brin subies par des NHDF quand ils sont irradiés en plein champ ou en bordure de champ.

2- D'analyser si les cassures subies sont réparées ou persistantes et d'en analyser les conséquences sur le devenir cellulaire en terme de progression dans le cycle cellulaire et entrée en sénescence.

Mise au point du système expérimental d'irradiation de fibroblastes en bordure de champ et techniques de biologie utilisées

Afin de répondre aux questions posées sur la nature et la quantité de dommages à l'ADN induits en bordure du champ et en plein champ, ainsi que sur le devenir cellulaire, il a fallu choisir les méthodes expérimentales les plus appropriées.

La première étape a consisté en l'élaboration d'un système expérimental permettant d'irradier des cellules en plein champ et en bordure du champ dans des conditions les plus proches possibles des conditions thérapeutiques.

Dans une deuxième étape nous avons choisi les différentes techniques à utiliser pour répondre au mieux aux questions posées :

1- Le premier objectif était d'évaluer la quantité de CSB et CDB induites par l'irradiation. Pour ce faire nous avons choisi deux techniques expérimentales différentes, à savoir l'immunofluorescence et les essais comètes. L'immunofluorescence nous permet de détecter les protéines nucléaires impliquées dans la signalisation des cassures de l'ADN, et les essais comètes nous permettent de détecter la quantité physique des cassures. Nous pouvons ainsi confronter

deux techniques d'évaluation des cassures, avec une technique indirecte et une technique directe.

2- Le deuxième objectif était de suivre le devenir des cellules irradiées en terme de croissance, d'arrêt dans le cycle, d'induction de sénescence.

- Pour évaluer la croissance cellulaire, la méthode a consisté à compter les cellules régulièrement pendant le traitement et de réaliser une courbe de croissance.
- Pour suivre la position des cellules dans leur cycle, nous avons utilisé une méthode de marquage par l'iodure de propidium suivi de cytométrie en flux. l'IP est un intercalant de l'ADN qui permet de quantifier la quantité d'ADN dans le noyau et ainsi la position dans le cycle. La cytométrie permet d'échantillonner un très grand nombre de cellules (minimum 10 000). On peut ainsi connaître le pourcentage de cellules de notre échantillon qui se trouvent en phase G1, S et G2/M.
- Pour suivre l'induction de la sénescence, nous avons également fait le choix de procéder par cytométrie en flux. De cette façon nous avons eu la possibilité de suivre trois marqueurs qui sont la taille, la granularité et l'activité de l'enzyme SA-Beta-Galactosidase en utilisant le substrat fluorigène 5-dodecanoylamino fluorescein di-beta-D-galactosidase (C12FDG)(DEBACQ-CHAINIAUX et al. 2009). Même si bien d'autres facteurs sont augmentés lors de la sénescence, nous avons ici avec ces trois facteurs qui augmentent à la sénescence la possibilité d'estimer l'établissement de celle-ci.

4.1 Culture de fibroblastes humains normaux

Les cellules qui ont été choisies pour les irradiations sont des NHDFs (Normal Human Dermal Fibroblasts) parce que ce sont des cellules extraites d'un tissu conjonctif susceptible de développer un sarcome secondaire après radiothérapie. Les cellules poussent en adhérant au fond de boîtes de culture en plastique. Elles sont cultivées comme indiqué dans l'encart 4.1. Pour les irradiations plein champ et bordure de champ, les boîtes de culture cellulaire utilisées ont été, en fonction de l'expérience à réaliser, des plaques 96 puits ou des plaques 6 puits.

Les NHDF utilisés dans cette étude sont issus de deux donneur de sexe masculin et de race caucasienne : le donneur F-1MC (Promo-Cell) âgé de 1 an et le donneur F-6MC1 âgé de 6 ans. Les cellules ont été cultivées dans des incubateurs à 5% CO₂ et à 37°C dans un milieu de culture spécifique : milieu de base (FBM- Fibroblast cell Basal Medium-Lonza) supplémenté par 2% de sérum du veau fœtal (FBS- Foetal Bovine Serum), du facteur de croissance des fibroblastes humain (hFGF), de l'insuline 5mg/ml et des antibiotiques (Gentamicine 50µg/ml et Amphotéricine B 50µg/ml). Pour entretenir les cultures, les cellules sontensemencées à 200 000 cellules/ boîte de Pétri 100 mm et sont répliquées à 70% de confluence à l'aide du Reagent PackTM de Clonetics® (Hepes buffered saline solution, Trypsine/EDTA (25mg et 10mg pour 100ml), TNS (Trypsin Neutralizing Solution)).

TABLEAU 4.1 – *Protocole culture cellulaire.*

Le doublement de population est calculé à chaque passage après comptage des cellules à l'aide d'une cellule de Thoma ou de Malassez par la formule :

$$DP = \frac{\ln(N_{coll}/N_{ens})}{\ln 2} \quad (4.1)$$

avec N_{coll} le nombre de cellules collectées et N_{ens} le nombre de cellule ensemençées

4.2 Analyse des foyers XRCC1 et 53BP1 et technique de microscopie à haut contenu

Afin de quantifier la quantité CSB et CDB induites par les irradiations, il a été question de mesurer par immunofluorescence la quantité de foyers XRCC1 et 53BP1 pour respectivement les CSB et les CDB (voir encart 4.2). En effet nous avons fait le choix de suivre les protéines XRCC1 et 53BP1 de part leur importance dans les systèmes de signalisation des CSBs et CDBs. Ainsi ces protéines donnent une mesure indirecte de la quantité de dommages CSB et CDB induits par les irradiations. De plus, en suivant leur persistance ou leur

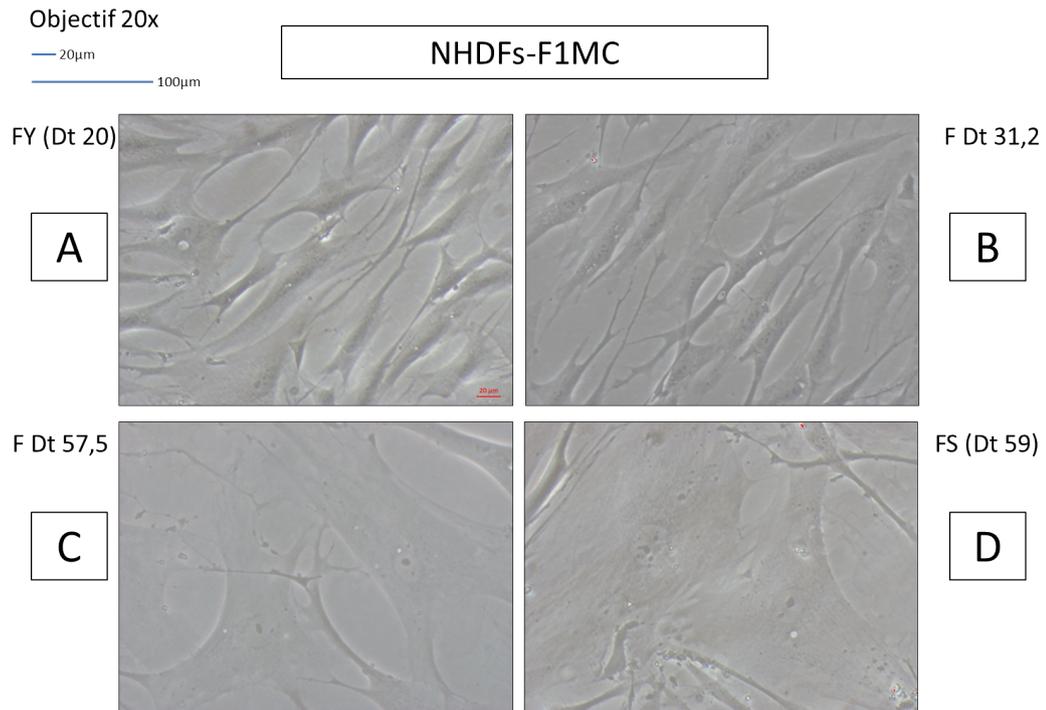


FIGURE 4.1 – Images de cellules NHDFs-F1MC prises à différents doublements de population en microscopie à contraste de phase.

- A : cellules F1MC jeunes, doublement de population 20
- B : cellules F1MC en prolifération, doublement de population 31.2
- C : cellules F1MC pré-sénescents, doublement de population 57.5
- D : cellules F1MC sénescents, doublement de population 59

disparition dans le temps cela nous donne informations quant à leur réparation. (NASSOUR et al. 2016).

L'acquisition des images a été réalisée par microscopie haut contenu qui permet une capture automatique d'un nombre important d'images, et donc en aval une analyse non-biaisée et de haute valeur statistique. Cette technique a été utilisée dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Priscille BRODIN (CNRS UMR 8204), et en particulier avec l'assistance de Gaspard DELOISON et Alexandre VANDEPUTTE.

Ainsi grâce à cette technique nous avons analysés pour chaque expérience utilisant les plaques 96 puits, autour de 1000 cellules par puits et autour de 10 000 cellules par colonnes donc par condition (en effet une colonne équivaut à une condition, à savoir soit PTV, soit pénombre ou soit ombre).

La figure 4.2 montre les signaux XRCC1 et 53BP1 obtenus pour une irradiation à 2 Gy dans le PTV. Pour effectuer l'analyse nous avons utilisé un logiciel d'analyse d'image Columbus du fabricant Perkin Elmer (¹) pour mesurer le nombre des foyers par noyau qui reflète le nombre de cassures à l'ADN et l'intensité de fluorescence qui reflète la quantité de protéines recrutées par foyer et qui peut augmenter au cours du temps lorsque les cassures ne sont pas réparées. La figure 4.3 montre les différentes possibilités de mesure par l'analyse d'image ainsi que le choix qui a été fait pour ce travail de thèse, à savoir une détection des foyers par niveau de contraste et un suivi de l'intensité de ces foyers par rapport à la moyenne de l'intensité du noyau dans lequel se trouve le foyer.

Nous pouvons noter ici que sur la figure 4.2 les foyers XRCC1 sont beaucoup plus petits que les foyers 53BP1 et que le bruit de fond est plus important également pour le signal XRCC1. De fait, cela n'a pas facilité leur détection et donc leur quantification qui s'est révélée assez délicate, avec notamment des barres d'erreur importante.

Afin de déterminer le meilleur temps d'incubation à 37 °C après irradiation et après le transport des cellules nous avons réalisés une cinétique de formations des foyers XRCC1 et 53BP1. C'est l'objet de la sous-section suivante.

1. <http://www.perkinelmer.com/product/image-data-storage-and-analysis-system-columbus>

Les cellules sont cultivées dans des plaques 96 puits, ou des plaques 6 puits. Après irradiation, elles sont fixées par la formaldéhyde (37 % de formaldéhyde) et perméabilisées par du triton (1% dans du PBS (Phosphate Buffer Saline, formule : 3.2mM de Na₂HPO₄, 0.5mM de KH₂PO₄, 1.3mM de KCl, 135mM de NaCl, pH=7.4)) pendant 20 minutes à température ambiante. Après rinçage par du PBS les sites aspécifiques sont bloqués 1 heure avec du lait écrémé dilué à 5% dans du PBS. Les cellules sont ensuite incubées dans une solution d'anticorps primaire dilué dans le tampon de blocage. Les anticorps utilisés sont : anti 53BP1 (dilué au 1/100e) (Santa Cruz Biotechnology, sc-22760), et anti XRCC1 (dilué au 1/100e) (Santa Cruz Biotechnology, sc-11429). Après plusieurs lavages avec du PBS, les cellules sont incubées dans une solution d'anticorps secondaire dilué au 1/500e (Life Technologies, A21206) dirigé contre les immunoglobulines de lapin et couplé à un fluorochrome (ALEXA FLUOR 488). Après lavages, les noyaux sont colorés par une solution de Hoechst 33342 (Sigma) à 5mg/L dans du PBS. L'acquisition des images des différentes plaques 96 puits a été réalisée de manière automatique par le système d'imagerie à haut-contenu Operetta de Perkin Elmer (HCS : Operetta High-Content Imaging System). Les photos ont été prises avec un objectif 63X. Le comptage des foyers 53BP1 et XRCC1 a été réalisée avec un logiciel d'analyse d'image Columbus par Perkin Elmer.

TABLEAU 4.2 – *Protocole d'immunofluorescence pour la détection des foyers 53BP1 et XRCC1.*

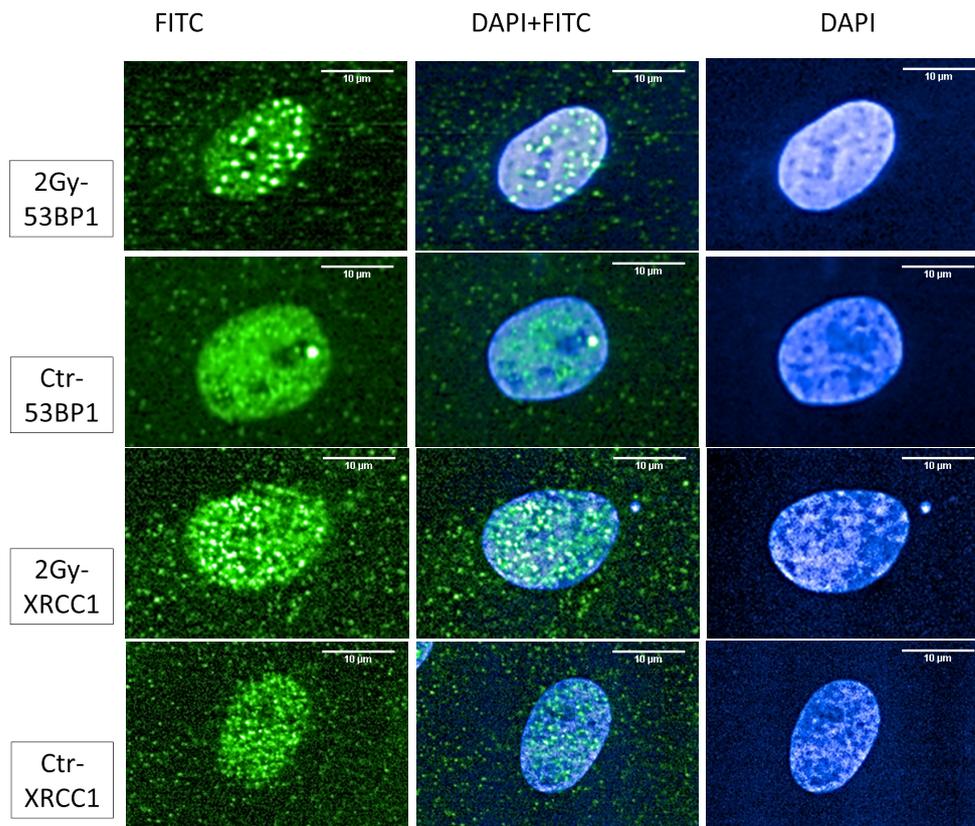


FIGURE 4.2 – Exemples de foyers 53BP1 et XRCC1 obtenus après une irradiation de 2 Gy de cellules NHDFs-F1MC placées dans le PTV.

Cinétique de formation des foyers XRCC1 et 53BP1

Nous nous sommes intéressés à la cinétique d'apparition des foyers XRCC1 et 53BP1 après une irradiation en plein champ de 2 Gy. L'objectif de cette expérience était de déterminer le pic de recrutement des protéines XRCC1 et 53BP1 dans nos conditions expérimentales. Il était nécessaire de déterminer le pic de recrutements des protéines étudiées pour choisir le meilleur temps de fixation des cellules après irradiation et ainsi être en mesure d'observer efficacement la quantité de cassures radio-induite.

Pour ce faire nous avons utilisé des NHDFs-F1MC platées dans des boîtes 96 puits et nous les avons exposé à une dose de 2 Gy. Des plaques 96 puits de cellules NHDFs-F1MC contrôle non-irradiées sont placées en dehors du

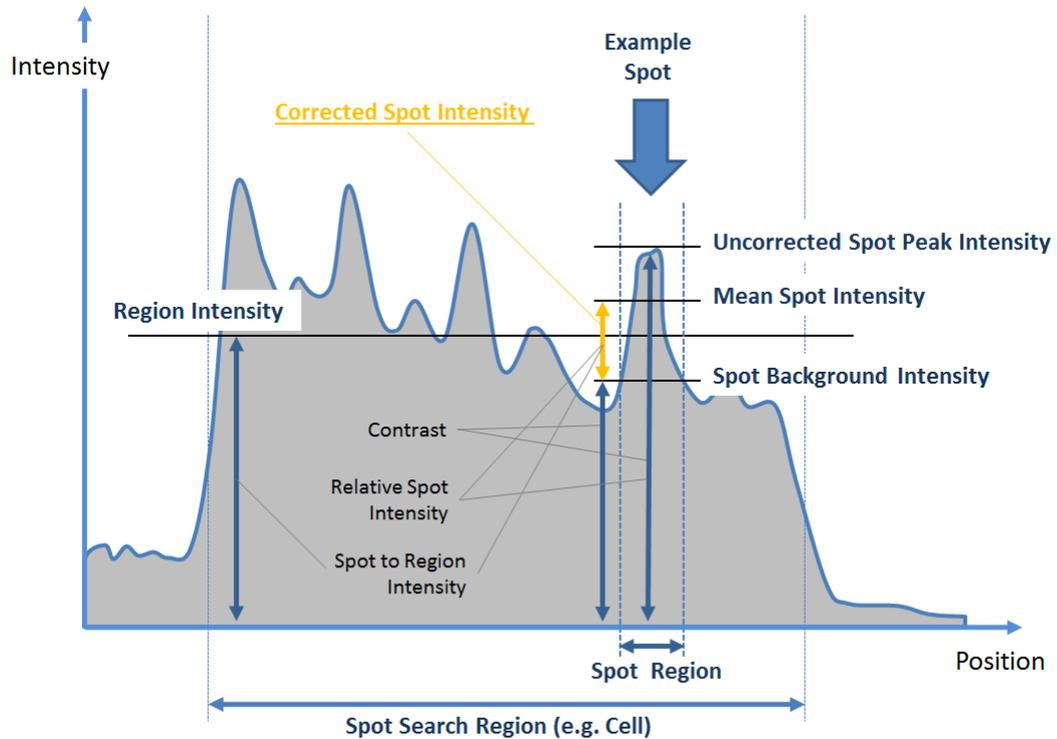


FIGURE 4.3 – Méthode d'analyse des foyers 53BP1 et XRCC1 à l'aide du logiciel d'analyse d'image Columbus. Les foyers ont été détectés sur la base du niveau de contraste c'est à dire l'intensité non corrigée du spot par rapport au bruit de fond autour du spot, défini sur le schéma par le rapport entre "Uncorrected Spot Peak Intensity" et "Spot Background Intensity". Une deuxième méthode d'analyse a consisté à analyser l'intensité moyenne des spots par rapport à la moyenne de l'intensité des noyaux, c'est à dire sur le schéma on compare "Corrected Spot Intensity" à "Region Intensity".

bunker contenant le LINAC. Ensuite nous avons fixé les cellules à différents temps post-irradiation et réalisé les immunofluorescences dirigées contre les protéines XRCC1 et 53BP1. Les cellules contrôle non irradiées ont été fixées au temps 0' post-irradiation. Les résultats sont regroupés dans la figure 4.4. Ces graphiques présentent en abscisse le temps pendant lequel les cellules sont remises à l'incubateur après irradiation et avant la fixation. Il faut en plus de ce temps de remise à l'incubateur prendre en compte le temps nécessaire pour faire le trajet entre la machine Clinac et le laboratoire qui est d'environ 30 minutes. Pendant ce temps de trajet les cellules restent à température ambiante. Nous avons réalisé l'ensemble des expériences de ce travail de thèse dans ces conditions. En ordonnée, nous présentons le ratio du nombre de foyers moyen par cellule dans la condition irradiée sur le nombre de foyers moyen par cellule de la condition non-irradiée. Nous adopterons cette méthodologie d'analyse pour l'ensemble de la suite du travail sur les protéines XRCC1 et 53BP1.

Pour les foyers 53BP1, nous observons un pic de recrutement des protéines entre 30 min et 1h après l'irradiation. En effet le ratio est alors compris entre 12 et 14. Après 8h, des foyers 53BP1 sont encore présents avec un ratio égal environ à 5.(Cf. figure 4.4)

Pour les foyers XRCC1, nous observons une tendance similaire avec un pic de recrutement des protéines entre 30 min et 1h après irradiation. Le ratio est alors compris entre 3.5 et 4. De la même façon après 8h, des foyers XRCC1 sont encore présent avec un ratio légèrement supérieur à 1.(Cf. figure 4.4)

Nous pouvons conclure de cette expérience que dans les conditions de nos expériences le pic de recrutement des foyers 53BP1 est en cohérence avec ce qui est classiquement montré dans la littérature. En revanche, le pic de recrutement des foyers XRCC1 est moins rapide, en comparaison au temps plus court de 10 min que l'on trouve habituellement dans la littérature (WEI et al. 2013). Notons ici une variable importante concernant la fixation des cellules qui pourrait être à l'origine de cette différence observée entre nos conditions expérimentales et la littérature. En effet pour des raisons techniques un temps de transport allant de 10 à 30 minutes été nécessaire pour se rendre de la salle d'irradiation au laboratoire et durant ce temps les cellules étaient maintenues à température ambiante. Ceci pourrait donc influencer les systèmes enzymatiques de signalisation des

cassures de l'ADN et donc le temps nécessaire pour recruter les protéines de signalisation aux sites des cassures.

4.3 Essais comète pour la recherche de cassure-simple et double-brin

Cette méthode d'électrophorèse sur cellule unique consiste en l'inclusion de cellules dans un gel d'agarose sur une lame de microscope, une lyse permettant de perméabiliser les membranes, une électrophorèse dans un milieu alcalin à pH=12.3 pour la détection des CSB et CDB ou dans un milieu neutre pH=8 pour la détection des CDB uniquement (Voir encart 4.3)(On exploite ici la chimie spécifique de la dénaturation de l'ADN (voir page 42)). Un marquage de l'ADN par un agent fluorescent permet l'analyse de la quantité de fragments d'ADN ayant migré électrophorétiquement. Classiquement il est question de mesurer le "Tail Moment" qui est défini par :

$$\text{Tail Moment} = \frac{\text{intensité de fluorescence de la queue} \cdot \text{longueur de la queue}}{\text{intensité de fluorescence totale}} \quad (4.2)$$

Le Tail Moment nous donne une mesure relative du nombre de cassures à l'ADN. Pour pH=8, il s'agit des CDB et pour pH=12.3 il s'agit à la fois des CDB et CSB. Une soustraction nous permet d'obtenir le niveau de CSB.

La figure 4.5 montre un exemple d'image de comètes obtenu après une irradiation à 2 Gy de cellules NHDFs-F1MC placées dans le PTV. Celle-ci nous permet de distinguer la tête de la comète et la mesure de la taille de la queue de la comète.

Pour obtenir l'expertise nécessaire à la mise en place de cette technique dans notre laboratoire nous avons collaboré avec l'équipe de Fabrice Nesslany (Institut Pasteur de Lille).

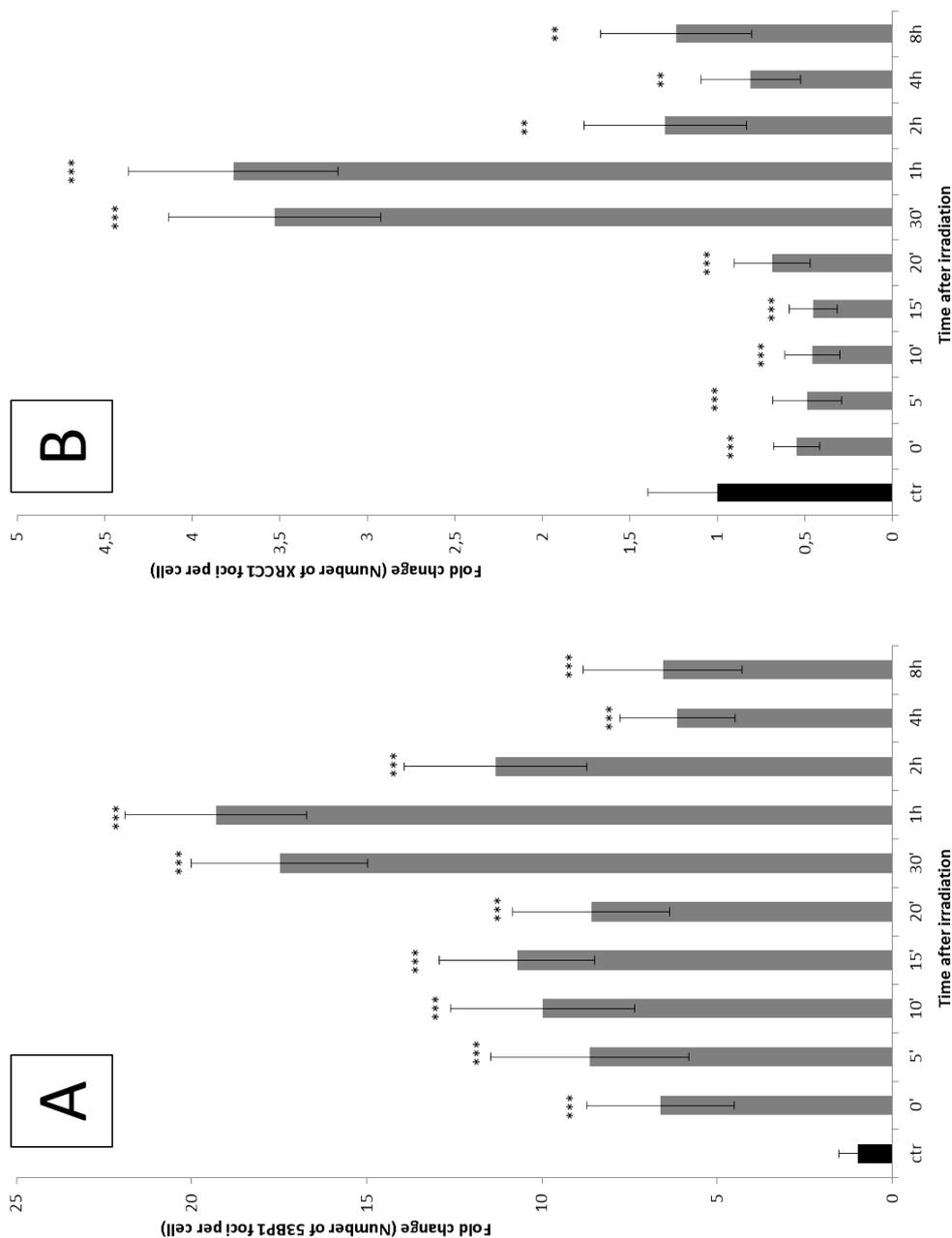


FIGURE 4.4 – Cinétique de formation des foyers 53BP1 (Panel A) et XRCC1 (Panel B) après irradiation de NHDFs-F1MC soumises à une dose de 2 Gy dans le PTV. Le temps après irradiation commence après remise à l'étuve des cellules et donc après le transport (autour de 30 min). Les barres représentent la moyenne et l'écart-type du ratio du nombre de foyers 53BP1 (panel A) et XRCC1 (panel B). Le ratio est celui du nombre de foyers obtenu pour les cellules irradiées sur le nombre de foyers obtenu pour les cellules non-irradiées. Des tests statistiques selon la méthode de Student entre condition non-irradiée et condition irradiée ont été réalisés. NS ($p > 0.05$) : différence non significative, * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) : différence significative.

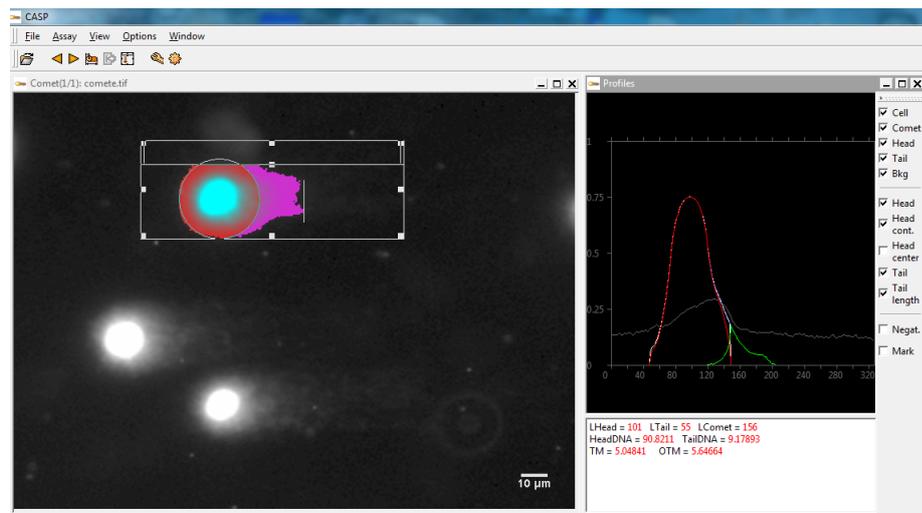


FIGURE 4.5 – Exemple d'analyse des comètes obtenues après irradiation au moyen du logiciel CaspLab (<http://casplab.com/>). Dans cette analyse il est question de détecter la tête de la comète et la queue de la comète sur la base de l'intensité de fluorescence. En rouge on retrouve la tête de la comète qui représente l'ADN n'ayant pas migré et en rose la queue de la comète qui représente l'ADN ayant migré. Ceci permet ensuite de calculer le Tail Moment via la formule 4.2.

Les cellules sont récupérées par centrifugation. On réalise un mélange de 2000 cellules avec 140 μ l d'agarose low melting point à 0.5% à 42°C. La suspension est répartie sous forme de gouttelettes de 10 μ l déposées dans des puits de lames spécifiques (Thermo scientific) de sorte que chaque puits contienne une centaine de cellules. Les lames sont portées 30 min à 4°C pour que l'agarose se solidifie. Les cellules sont perméabilisées par immersion des lames dans un tampon TRIS 10mM, EDTA 100mM, triton X-100 (1%) et NaCl 2,5M à 4 °C pendant 1 heure et à l'obscurité du fait du caractère hautement photosensible de l'ADN. Ensuite, les lames sont équilibrées dix minutes dans le tampon de migration électrophorétique. Deux tampons de migration électrophorétique sont utilisés : EDTA 2mM, NaOH 30mM, pH12,3 et Tris 89mM, Acide borique 89mM, EDTA 2mM, pH8. L'électrophorèse est réalisée dans une cuve horizontale à voltage fixe, 20V pour le tampon à pH12,3 et 30V pour celui à pH8, et pendant 20 et 25 minutes respectivement. Après électrophorèse, les lames ayant migré dans le tampon alcalin sont neutralisées au moyen d'un tampon TRIS 0.4M pH7,4. Le marquage de l'ADN est fait soit par le Sybr green (InVitrogen) dilué au 1/10000e dans du Tris 10mM, EDTA 1mM pour les fragments d'ADN bicaténaires (pH8), soit avec l'iodure de propidium (Calbiochem) dilué à 2.5 μ g/ml dans de l'eau pour les fragments d'ADN monocaténaires (pH12,3). Les résultats sont analysés à l'aide d'un microscope à épifluorescence Zeiss Axio-plan2® couplé à une caméra CCD. La mesure du Tail Moment est réalisé à l'aide du logiciel CaspLab à partir des photos.

TABLEAU 4.3 – *Protocole de réalisation des essais comètes pour la détection des cassures simple et double-brin après irradiation.*

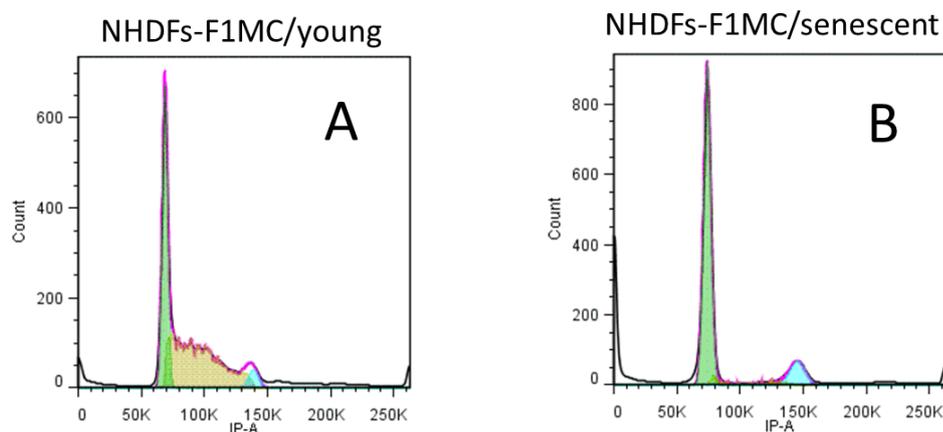


FIGURE 4.6 – Analyse du cycle cellulaire de NHDFs-F1MC en croissance exponentielle (Panel A) et au plateau de sénescence (Panel B)

- Panel A : En vert la phase G1/G0, en jaune la phase S et en bleu la phase M détectées via le logiciel FlowJo.
- Panel B : En sénescence, on remarque la disparition de la phase S et une augmentation des cellules en phase G1 principalement

4.4 Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux

La quantité d'ADN par cellule varie au cours du cycle cellulaire. L'iodure de propidium (IP) se lie d'une façon stoechiométrique à l'ADN permettant ainsi une mesure du contenu en ADN de chaque cellule par cytométrie en flux, ce qui rend au final possible l'étude de la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire à savoir G0/G1, S et G2/M. La figure 4.6 montre l'analyse du cycle cellulaire de NHDFs-F1MC en phase de prolifération versus de NHDFs-F1MC au plateau de sénescence.

4.5 Analyse de la sénescence par cytométrie en flux

Afin d'évaluer l'induction du phénotype sénescence dans les cellules irradiées nous avons analysé par cytométrie en flux trois marqueurs de sénescence :

Les cellules après irradiation sont fixées au moyen d'une solution d'éthanol à 70 %. Elles sont ensuite laissées à 4°C pendant au moins 24h pour assurer la perméabilisation. Les cellules sont centrifugées et sont rincées à l'aide d'une solution de PBS (Phosphate Buffer Saline, formule : 3.2mM de Na₂HPO₄, 0.5mM de KH₂PO₄, 1.3mM de KCl, 135mM de NaCl, et ph=7.4)). Après rinçage, les cellules sont centrifugées et resuspendues dans 500 µl d'une solution d'IP à 40 µg/mL dans du PBS contenant 100 µg /mL de RNase pendant au moins 30 min dans l'obscurité. La lecture des résultats se fait à l'aide d'un cytomètre de marque BD Canto II. La quantification des cellules dans les différentes phases du cycle est réalisée à l'aide du logiciel FlowJo.

TABLEAU 4.4 – *Protocole d'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux.*

- l'augmentation de l'activité SA- β -galactosidase en utilisant le substrat C12FDG. Le C12FDG est un β -D-galactopyranoside (substrat naturel de la β -galactosidase lysosomale) modifié de manière covalente pour inclure un groupe fonctionnel C-12 lipophile. Une fois à l'intérieur de la cellule, le substrat est clivé par l'enzyme β -galactosidase produisant un produit fluorescent qui reste capturé dans la cellule, ceci par incorporation de la queue C-12 lipophile dans la membrane cellulaire. L'intensité de fluorescence nous donne donc une mesure de l'activité enzymatique.
- l'augmentation de la taille
- la granularité cellulaire.

Les figures 4.7 et 4.8 montrent d'une part un exemple de mesure de l'activité SA- β -gal, et d'autre part un exemple de mesure de la taille et de la granularité dans des NHDFs-F1MC en phase de croissance exponentielle ou au plateau de sénescence.

4.6 Paramètres d'irradiation

L'accélérateur choisi pour effectuer les irradiations est un accélérateur d'électrons dédié à la radiothérapie, type Varian-Clinac® qui est utilisé au Centre Oscar Lambret (COL) de Lille où nous avons effectués l'ensemble des expé-

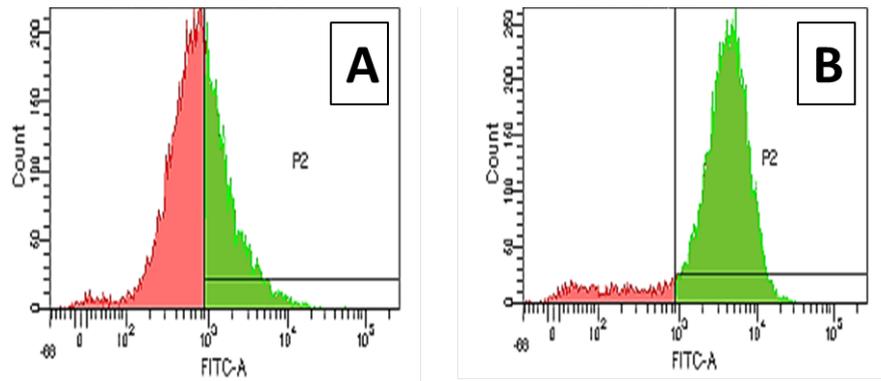


FIGURE 4.7 – Analyse de l'induction de sénescence par marquage C12FDG de cellules NHDFs-F1MC.

— Panel A : NHDFs-F1MC en phase de croissance

— Panel B : NHDFs-F1MC au plateau de sénescence

La zone P2 en vert correspond au seuil de positivité pour considérer que les cellules sont sénescentes. A l'inverse la zone en rouge correspond aux cellules qui ne seront pas comptabilisées comme étant sénescentes.

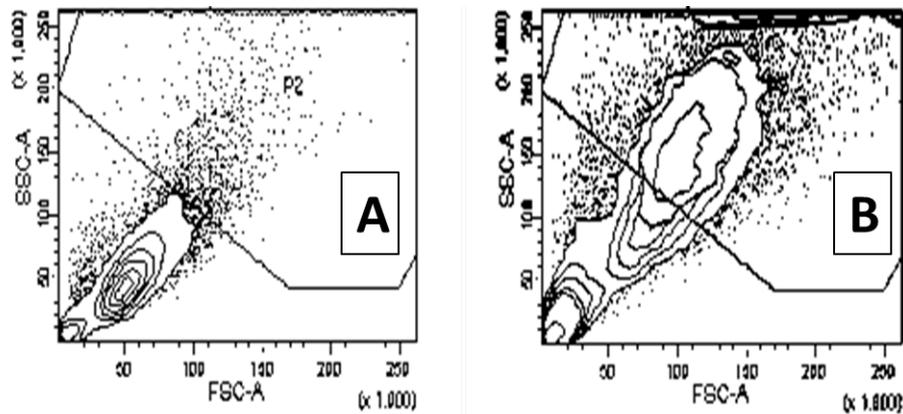


FIGURE 4.8 – Analyse de la sénescence à travers l'analyse de la taille et de la granularité de cellules NHDFs-F1MC.

— Panel A : cellules NHDFs-F1MC young

— Panel B : cellules NHDFs-F1MC sénescence

La zone P2 correspond aux cellules qui seront comptabilisées comme étant sénescentes puisqu'elles sont à la fois grosse et granulaire.

Les cellules sont cultivées dans des plaques 6 puits. Après irradiation, 1 ml d'une solution de milieu de culture à 33 μ M de C12FDG est déposé dans chaque puits. Ensuite les cellules sont incubées dans cette solution pendant 2h à 37°C. Après cette phase d'incubation les cellules sont rincées 2 à 3 fois à l'aide de PBS 1X à température ambiante. Les cellules sont récupérées à l'aide d'une solution de trypsine pendant 5 min à 37°C. L'activité de la trypsine est bloquée par l'ajout d'un neutralisateur. Les cellules sont centrifugées à 4°C pendant 4 min à 900 rpm. Enfin les cellules sont resuspendues dans 400 μ L de PBS froid. Le passage des cellules se fait immédiatement après à l'aide d'un cytomètre de marque BD Canto II.

TABLEAU 4.5 – *Protocole de marquage C12FDG.*

riences d'irradiations cellulaires en collaboration avec Eric LARTIGAU, Thomas LACORNERIE et Benoit VATRINET. Le choix de l'accélérateur a été fait pour deux raisons. La première raison est que c'est une machine qui est classiquement utilisée en radiothérapie ce qui nous permet de nous rapprocher des conditions réelles du traitement des patients et des effets de la bordure du champ. En effet les propriétés physiques de la marge n'étant pas clairement décrites dans la littérature nous avons choisi une machine dédiée à la radiothérapie plutôt qu'une machine dédiée à la recherche. La deuxième raison est qu'avec cette machine il est possible de réaliser des champs carrés, ce qui nous a permis d'irradier des cellules en plein champ ou en bordure de champ en utilisant des boîtes de culture rectangulaires. L'accélérateur est utilisé en mode photon.

De plus nous utilisons systématiquement un champ de taille 25x25 cm, en effet la taille de la bordure du champ est fonction de la taille du champ et nous voulions avoir des résultats reproductibles irradiation après irradiation.

Le débit de dose utilisé est de 3 Gy/min. Ce débit de dose est standard pour la machine utilisée.

4.6.1 Détermination du rendement en profondeur pour le LINAC utilisé et les énergies de faisceaux X disponibles

Dans cette expérience, il a été question de déterminer expérimentalement les rendements en profondeur pour les deux énergies disponibles du Varian-Clinac®, à savoir pour 6 MV et 20 MV. En pratique pour déterminer les rendements en profondeur nous avons utilisé une cuve remplie d'eau et un détecteur de particules (chambre d'ionisation). La mesure se fait à l'isocentre de l'appareil et le nombre de particules détectées est proportionnel au niveau de dose absorbée à la profondeur donnée. Les résultats de cette expérience sont regroupés dans la figure 4.9. Nous retrouvons dans ce graphique en abscisse la profondeur en eau et en ordonnée le pourcentage de dose absorbée à cette profondeur (6 MV et 20 MV). Nous considérons que le maximum de dose absorbée est atteint pour $D \geq 98\%$. Pour le faisceau de 6 MV, le maximum de dose absorbée se trouve pour une profondeur allant de 15 mm à 30 mm, alors que pour le faisceau de 20 MV qui est plus pénétrant, le maximum de dose absorbée se trouve pour une profondeur allant de 25 à 45 cm.

Ainsi en conclusion de cette expérience, pour réaliser nos irradiations et pour contrôler la dose absorbée par les cellules, nous avons placé les boîtes de cellules sur des plaques équivalent-eau (PMMA : polyméthacrylate de méthyle) d'une épaisseur de 2 cm pour des irradiations à 6 MV et de 4 cm pour des irradiations à 20 MV. Le fond des boîtes de culture cellulaire est placé à l'isocentre de l'appareil grâce au laser de positionnement et/ou de la télémétrie et l'irradiation est ensuite effectuée par le dessous des plaques. Ce faisant, la dose absorbée par les cellules placées au fond des boîtes de culture cellulaire est de 100 %.

4.6.2 Placement des boîtes de cellules en bordure du champ

Le placement des boîtes de culture 96 puits en bordure de champ se fait en se guidant grâce au champ lumineux. La limite de celui-ci étant réglée sur le 50% de la dose maximale reçue, les puits que l'on souhaite en pénombre sont placés de manière à ce que la limite du champ lumineux se trouve au centre des puits (voir figure 4.10). Ce faisant, les cellules des puits reçoivent une gamme de

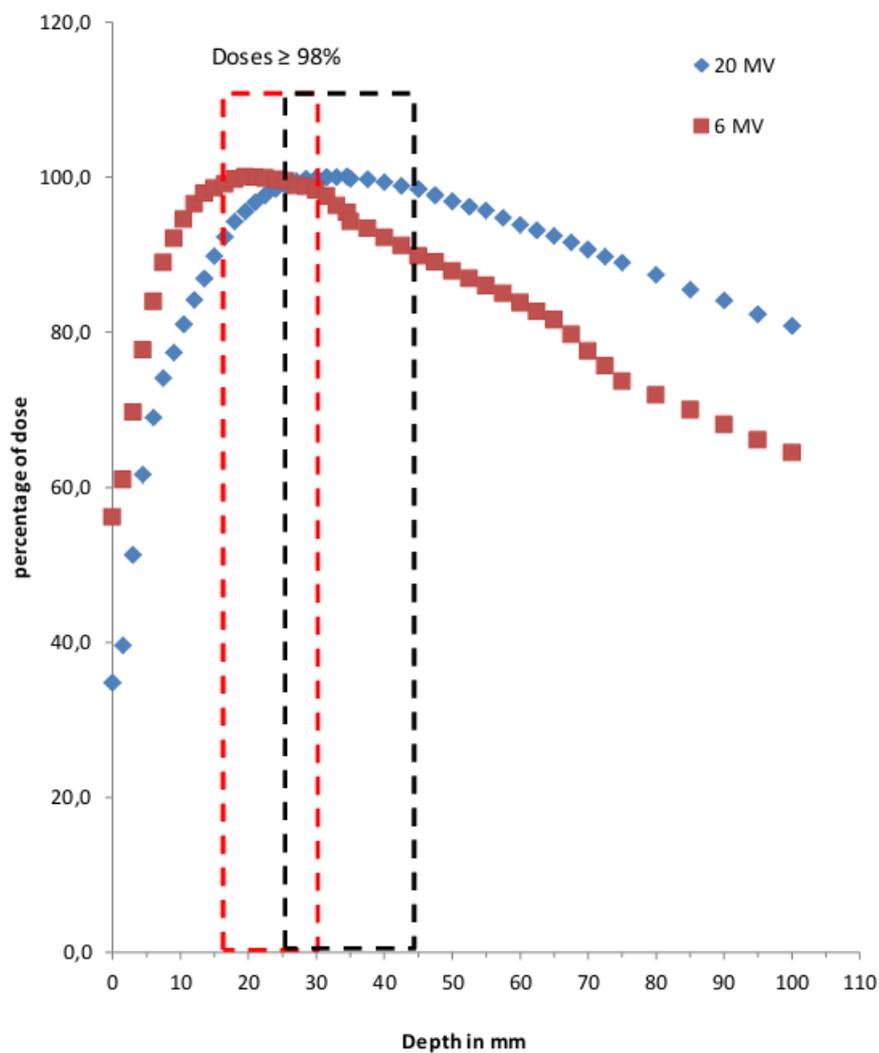


FIGURE 4.9 – Rendement en profondeur réalisé sur le Clinac utilisé pour irradier les cellules. Des rendements en profondeur pour des énergies de faisceaux de 6MV et de 20MV ont été réalisés dans une cuve d'eau. Le cadre en pointillé rouge et le cadre en pointillé noir pour respectivement 6 MV et 20 MV, représente la fenêtre de profondeur dans l'eau où la dose absorbée est supérieure à 98 %.

dose allant de 20% à 80% de la dose maximale et fournissent donc un modèle expérimental de la pénombre. Les puits adjacents à ce puits de pénombre se trouvent ainsi pour les uns en zone plein champ c'est à dire dans l'équivalent du PTV (100% de la dose maximale) et pour les autres en zone d'ombre (<20% de la dose)(voir figure 4.11). Au final, on a un modèle expérimental de la bordure de champ. Pour le placement des boîtes de culture 6 puits, le principe est le même, à ceci près que nous avons moins de précision quant au dépôt de dose. Nous pouvons seulement distinguer 3 zones, à savoir "PTV", "pénombre et ombre proche", "ombre lointaine". Enfin les fonds des boites où se trouvent placées les cellules sont placées à l'isocentre de l'appareil grâce au laser de positionnement et/ou de la télémétrie. Cela nous assure que la dose machine soit bien celle reçue par la monocouche cellulaire.

4.6.3 Validation du dépôt de dose dans le PTV et en bordure

Afin de valider notre système d'irradiation des fibroblastes, nous avons estimé le dépôt de dose dans les plaques 96 puits placées en bordure du champ d'irradiation. Nous avons d'abord réalisé l'imagerie par tomодensitomètre (scanner RX) de la plaque et la seconde étape a consisté à simuler la dose déposée dans chaque puit à l'aide du TPS ("treatment planning system") dédié à la dosimétrie en radiothérapie. Dans cette deuxième étape nous avons donc placé le faisceau d'irradiation de manière à avoir la première moitié de la plaque en plein champ et la seconde moitié de la plaque dans la zone de pénombre et dans la zone d'ombre. Nous avons ensuite créé des régions d'intérêt de 1 à 12 correspondant au nombre de colonnes de puits. Ainsi la colonne 1 se trouve dans le PTV, la colonne 6 dans la pénombre et la colonne 12 hors du champ d'irradiation. Ensuite le logiciel de calcul intégré au TPS donne le pourcentage de la dose totale déposée dans chaque volume. Le résultat de la simulation est montré dans le figure 4.11. La simulation montre clairement que la dose déposée dans les puits placés en plein champ reçoivent environ 100% de la dose totale administrée, les puits placés dans la pénombre reçoivent autour de 50% de la dose totale et enfin les puits placés dans l'ombre reçoivent autour de 20 %, 10%, 8%, 5% et 5% de la dose totale. Notons que même la colonne la plus éloignée du

bord du champ d'irradiation (5 cm) reçoit une dose non nulle de l'ordre de 0.1 Gy pour une irradiation de 2 Gy.

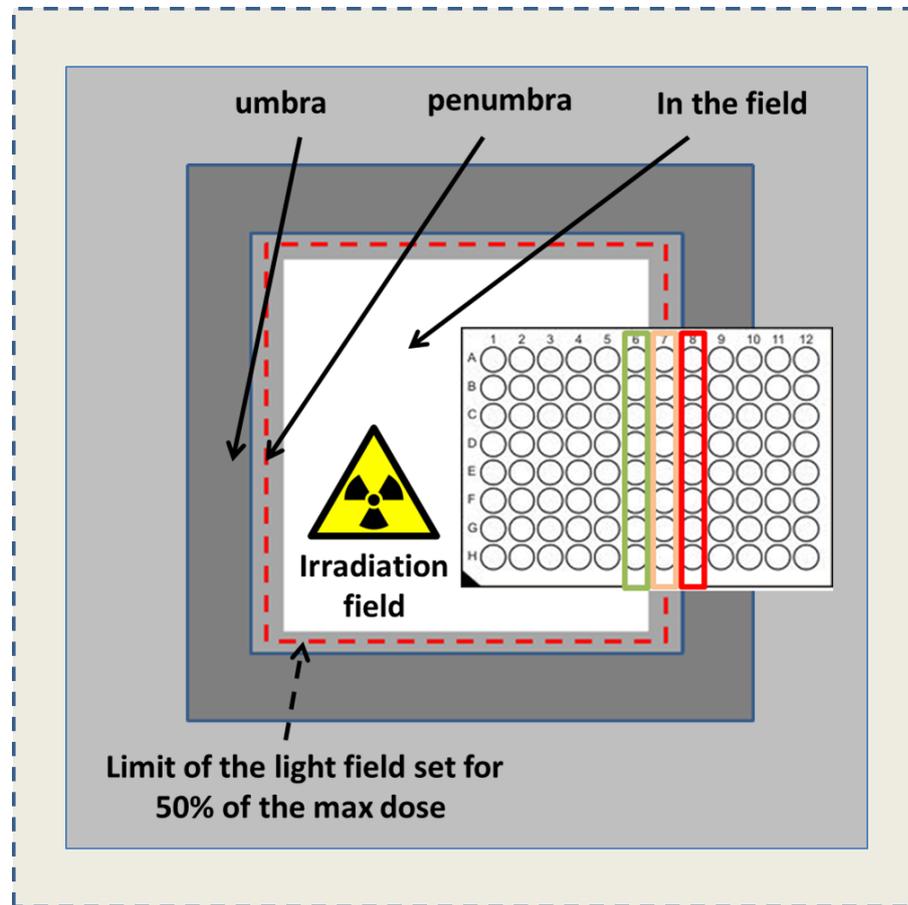


FIGURE 4.10 – Placement des plaques 96 puits de culture cellulaire en bordure du champ d'irradiation. Afin d'obtenir un système expérimental prenant en compte les différentes zones d'irradiation, à savoir PTV, pénombre et ombre, nous avons utilisé des plaques rectangulaires et chaque colonne de puits peut être ainsi placée dans les différentes zones. Au final des colonnes de puits se retrouvent dans le PTV (colonne verte), d'autres dans la pénombre (colonne orange) et les autres dans l'ombre (colonne rouge).

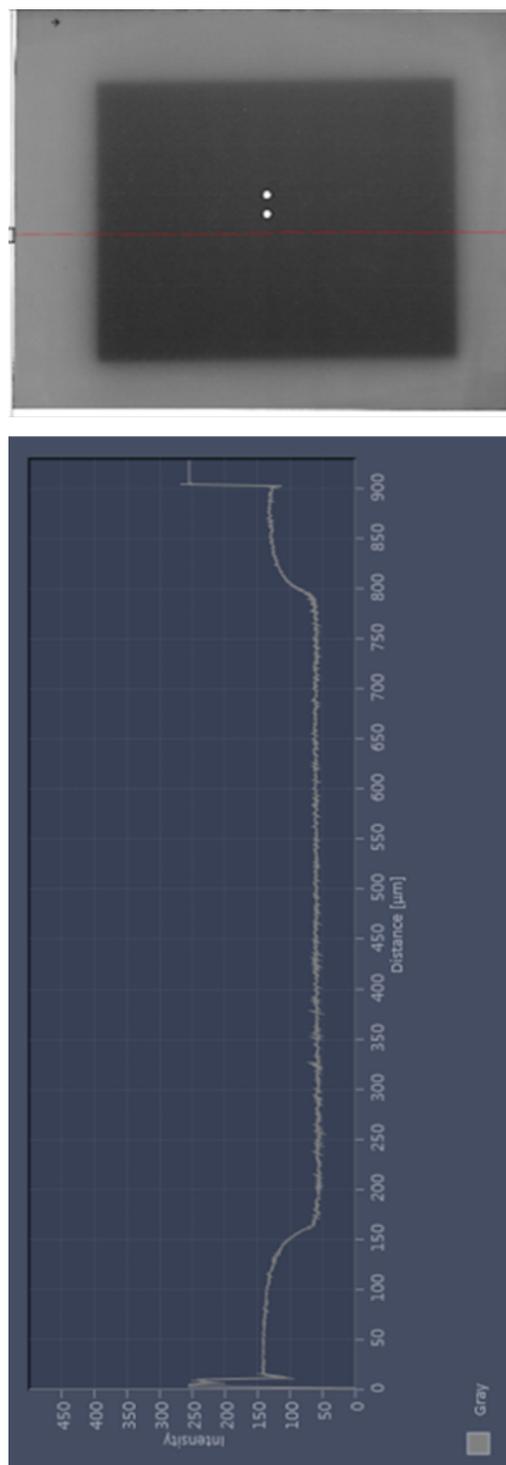


FIGURE 4.11 – Profil de dose pour un champ d'irradiation $10 \times 10 \text{ cm}^2$ de 20 MV obtenu au moyen d'un film radio-chromique. Compte tenu de la taille du film nous sommes limité à un champ $10 \times 10 \text{ cm}^2$. Nous pouvons observer le profil de dose avec les différentes régions PTV, pénombre et ombre (gauche) ainsi que le film radio-chromique irradié (droite)

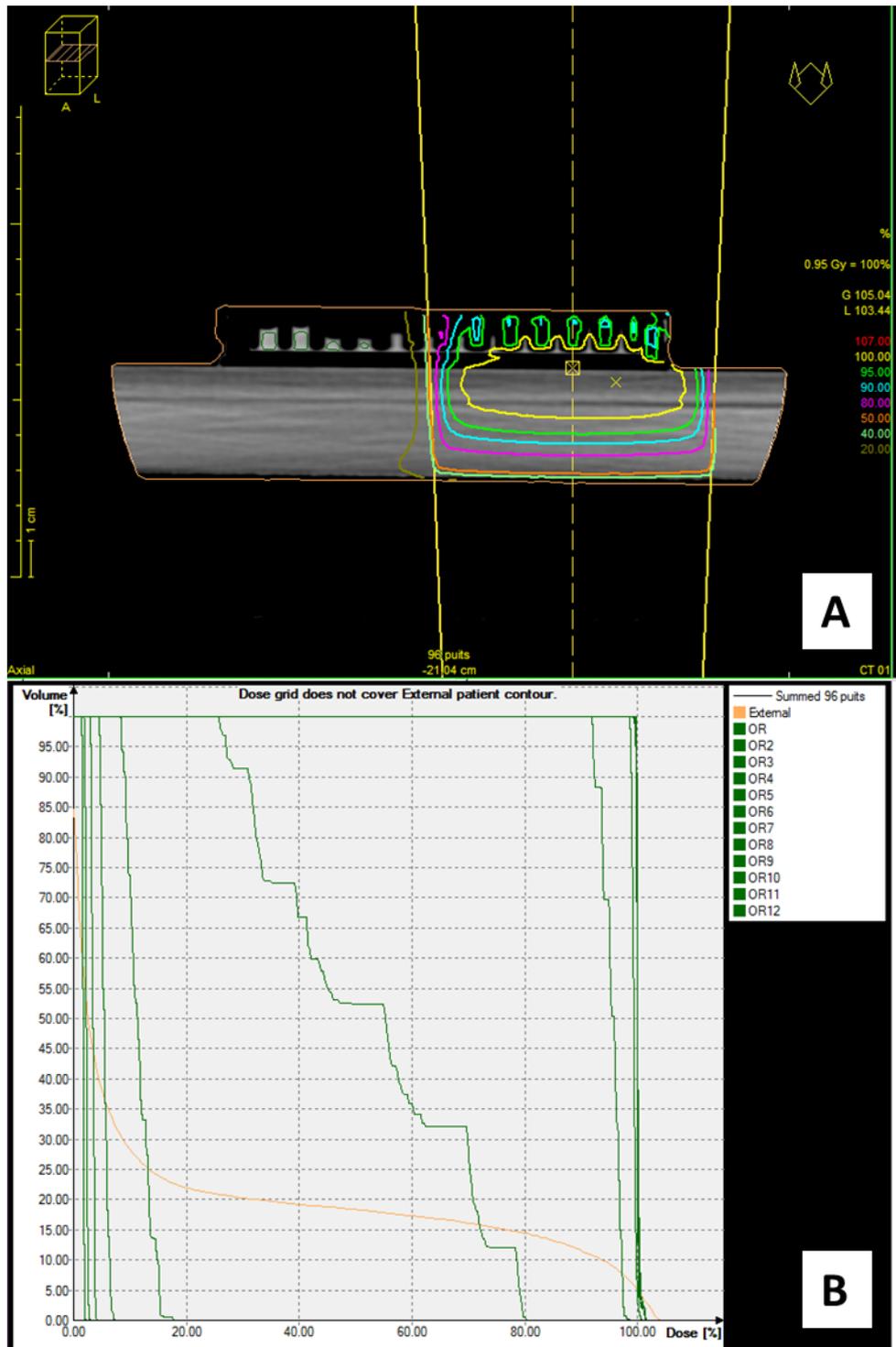


FIGURE 4.11 – Évaluation du dépôt de dose dans une plaque 96 puits placée en bordure du champ d'irradiation par dosimétrie. La plaque 96 puits et la plaque PMMA ont été imagées à l'aide d'un tomодensitomètre et une étude de dosimétrie à un champ d'irradiation a été réalisée au moyen du "system treatment planning" du Centre Oscar Lambret. La plaque 96 puits est placée sur 4 cm de plaque PMMA. Ensuite un faisceau d'irradiation de 20 MV vient irradier la moitié de la boîte en PTV, l'autre moitié se trouvant ainsi en pénombre et dans l'ombre.

- Panel A : Représentation des isodoses en profondeur. Les traits verticaux jaunes représentent les extrémités du faisceau d'irradiation, et le trait vertical en pointillé jaune la moitié de celui-ci. Les traits de couleurs représentent les isodoses : l'isodose 100% est représentée par un trait jaune et l'isodose 107 % qui représente la dose à ne pas dépasser dans le PTV apparaît en rouge. On peut visualiser que le fond des puits placés dans le PTV reçoivent bien 100 % de dose administrée.
- Panel B : Diagramme Dose-Volume cumulatif. Ce diagramme représente pour chaque colonne notée OR1 à OR12, la dose absorbée sur le volume des 8 puits constituant chaque colonne. Ainsi on visualise que les colonnes placées en plein champ reçoivent 100 % de dose, les colonnes placées en pénombre reçoivent en moyenne 50 % de dose et les colonnes placées en ombre reçoivent moins de 20 % de dose.

4.6.4 Choix de l'énergie du faisceau d'irradiation : 20 MV versus 6 MV

Rappelons qu'en radiothérapie 3D conventionnelle, le dosimètre utilise les différentes énergies de faisceau disponibles dans le but de délivrer au mieux la dose prescrite dans le PTV.

Nous avons réalisé une expérience dans le but de déterminer si l'énergie du faisceau influence la quantité de cassures à l'ADN pour une même dose.

Pour répondre à cette question des cellules NHDFs-F1MC ont été ensemencées dans des boîtes 96 puits. Ensuite les cellules ont été exposées à une dose plein champ de 2 Gy avec une énergie de faisceau de 6 MV ou de 20 MV. Pour cela nous utilisons le même protocole que décrit dans matériel et méthode avec comme différence l'épaisseur d'équivalent tissu entre les deux énergies. En effet pour 6 MV le maximum du dépôt d'énergie sur la courbe de rendement en profondeur se situe à 2 cm environ et pour 20 MV il se situe à 4 cm environ (Voir la figure 4.9). Ensuite nous avons réalisé l'immunofluorescence dirigée vers 53BP1. Les résultats sont regroupés dans la figure 4.12.

Les résultats montrent que la quantité de foyers 53BP1 par noyau dans les cellules irradiées augmente d'un facteur 10 environ par rapport aux cellules non-irradiées, sans différence significative entre 6 MV et 20 MV.

En conclusion de cette expérience, nous pouvons dire que l'énergie ne semble pas influencer de manière prépondérante la réponse des cellules en terme de génération de foyers 53BP1 .

Comme la fenêtre de dose 100% est plus grande pour 20 MV, nous avons choisi pour l'ensemble des expériences de ce travail de thèse cette énergie. En effet le rendement en profondeur pour l'énergie 20 MV est constant entre 25 et 45 mm alors que pour 6 MV il est constant sur une fenêtre plus étroite à savoir entre 16 et 30 mm (voir figure 4.9). Ce choix a été fait dans le but de contrôler plus efficacement la reproductibilité des expériences.

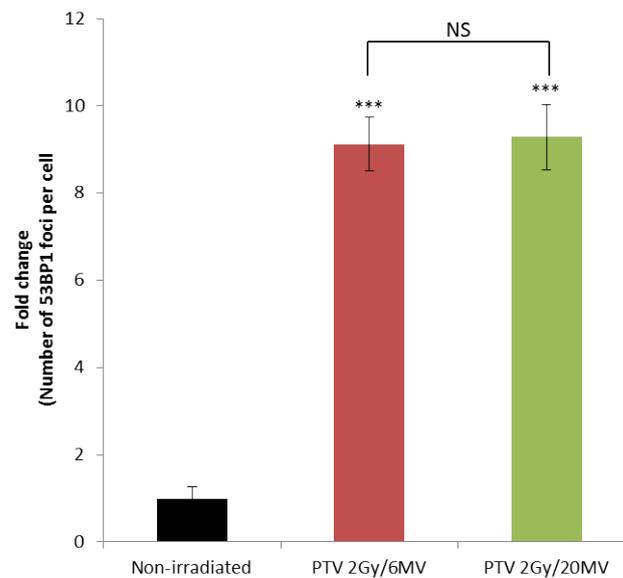


FIGURE 4.12 – Quantité de foyers 53BP1 par cellule après une irradiation de 2 Gy dans le PTV de cellules NHDFs-F1MC avec différentes énergies de faisceaux de 6 MV et de 20 MV. Les barres représentent la moyenne et l'écart-type du ratio du nombre de foyers 53BP1. Le ratio est celui du nombre de foyers obtenu pour les cellules irradiées sur le nombre de foyers obtenu pour les cellules non-irradiées. Des tests statistiques selon la méthode de Student entre condition non-irradiée et condition irradiée et entre les deux conditions irradiées (6 MV vs 20 MV) ont été réalisés. NS ($p > 0.05$) : différence non significative, * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) : différence significative.

Étude des cassures de l'ADN et du devenir cellulaire après irradiation à faibles doses

L'objectif principal de cette étude préalable était de vérifier la possibilité d'induire des dommages et des **effets biologiques avec des faibles doses, équivalentes aux doses déposées en bordure du champ d'irradiation.**

5.1 Quantité de CDB et CSB induites dans le PTV, pour des doses faibles, évaluée par essai comète

Afin d'évaluer la quantité de CSB et CDB induites dans le PTV pour des doses faibles, des NHDFs-F1MC ont étéensemencées dans des boîtes de culture classique. Ensuite elles ont été irradiées à différentes doses en plein champ, à savoir 0.1, 0.5, 1, 2, 4 et 8 Gy. La dose 2 Gy correspond à la dose classiquement administrée dans le PTV par séance d'irradiation. La dose de 1 Gy correspond à la dose moyenne reçue en pénombre. les doses de 0.1 et 0.5 Gy correspondent à des doses reçues dans l'ombre jusque 5 cm. Enfin les doses de 4 et 8 Gy ont été

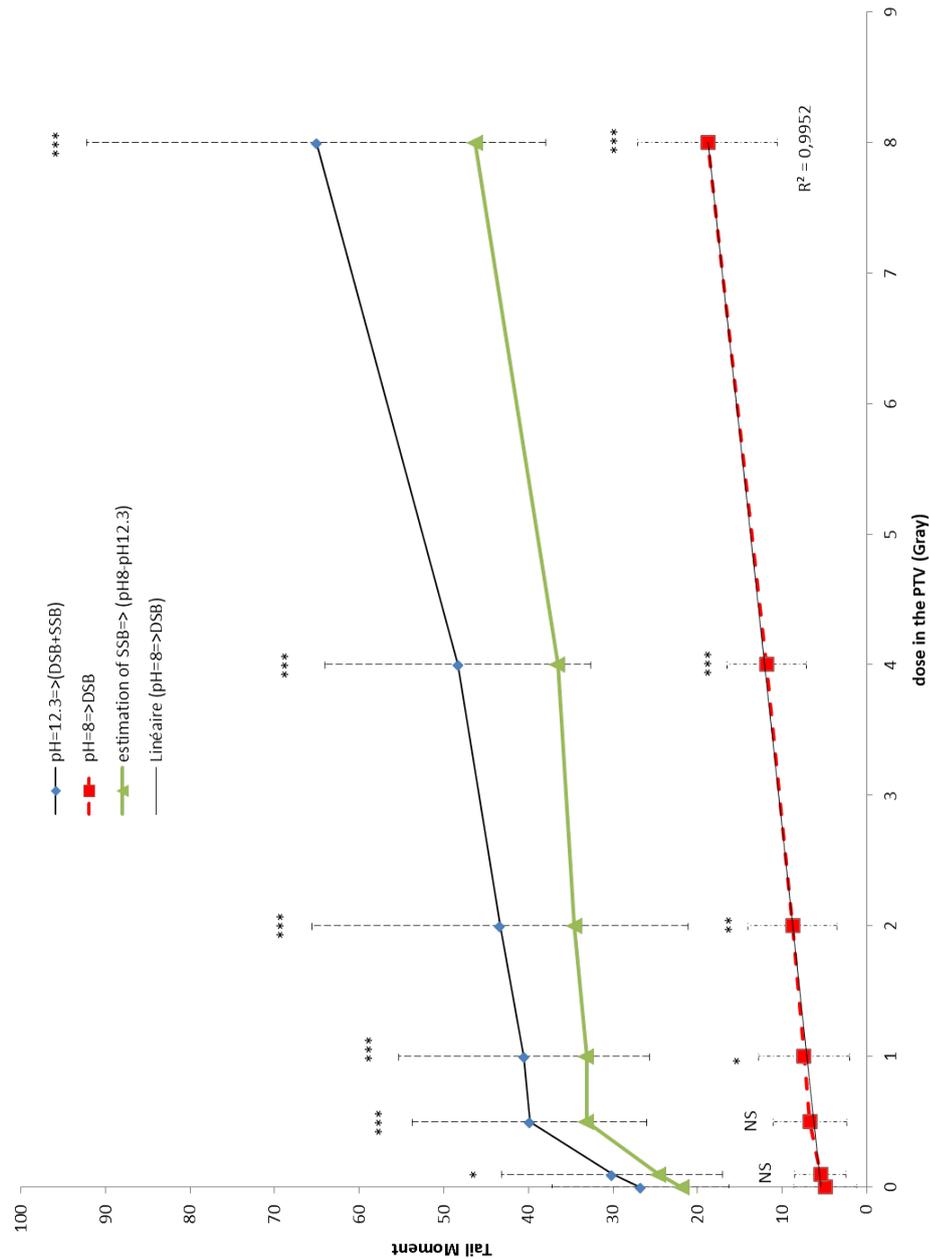


FIGURE 5.1 – Évaluation de la quantité de CSB et CDB après une irradiation à différentes doses et au moyen de la technique des essais comètes. Nous avons réalisé des irradiations de cellules NHDFs-F1MC à 0.1, 0.5, 1, 2, 4, et 8 Gy. Ensuite nous avons réalisé les essais comètes à pH=8 et à pH=12.3. Pour estimer la quantité de CSB nous avons réalisé une soustraction pH12.3-pH8. Chaque point représente la moyenne et l'écart-type de la mesure du tail moment de 100 cellules. Des tests statistiques selon la méthode de Student entre condition non-irradiée (0 Gy) et condition irradiée ont été réalisés. NS ($p > 0.05$) : différence non significative, * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) : différence significative.

utilisées comme contrôle positif. Pour évaluer la quantité de dommages induits par ces différentes doses des essais comètes on été réalisés à $pH = 8$ et $pH = 12.3$. De cette façon nous avons accès à la quantité de CDB ($pH = 8$), et à l'estimation de la quantité CSB (calcul $pH8 - pH12.3$) Les résultats sont regroupés dans la figure 5.1.

Comme attendu, pour la quantité de CDB, on observe une augmentation linéaire avec la dose. Concernant la quantité de CSB estimée, on observe une augmentation également avec la dose mais cette fois ci non-linéaire. En effet, on observe une brisure de la pente à 0.5 Gy. Ainsi nous avons une forte pente entre 0 et 0.5 Gy et une pente plus faible entre 0.5 et 8 Gy.

En conclusion de cette expérience, si la quantité de CDB augmente linéairement avec la dose, ce n'est pas le cas pour la quantité de CSB. En effet il semble y avoir une forte sensibilité aux faibles doses.

5.2 Croissance cellulaire durant une radiothérapie simulée à différentes doses

En radiothérapie classique le PTV et donc le volume tumoral doit recevoir une dose totale comprise entre 50 et 100 Gy. Afin de respecter l'équilibre entre destruction du tissu malade et reconstruction du tissu sain le traitement est fractionné, c'est à dire que le patient reçoit une fraction de la dose totale quotidiennement sauf le weekend jusqu'à atteindre la dose totale prescrite. En radiothérapie classique cette dose quotidienne est de 2 Gy.

Dans cette expérience nous avons donc voulu évaluer l'effet des faibles doses reçue en bordure du champ d'irradiation sur la croissance cellulaire en réalisant un traitement simulé avec les doses correspondantes. Ainsi des cellules NHDFs-F1MC ont été ensemencées dans des plaques 6 puits. Elles ont ensuite été irradiées avec différentes doses et ceci quotidiennement sauf les weekend pendant trois semaines. La dose quotidienne a été de 0.1, 0.3, 0.5, 0.75, 1 et 2 Gy. Les cellules ont été comptées régulièrement dans le but de pouvoir calculer le doublement de population avec l'équation 4.1. Les résultats sont regroupés dans la figure 5.2.

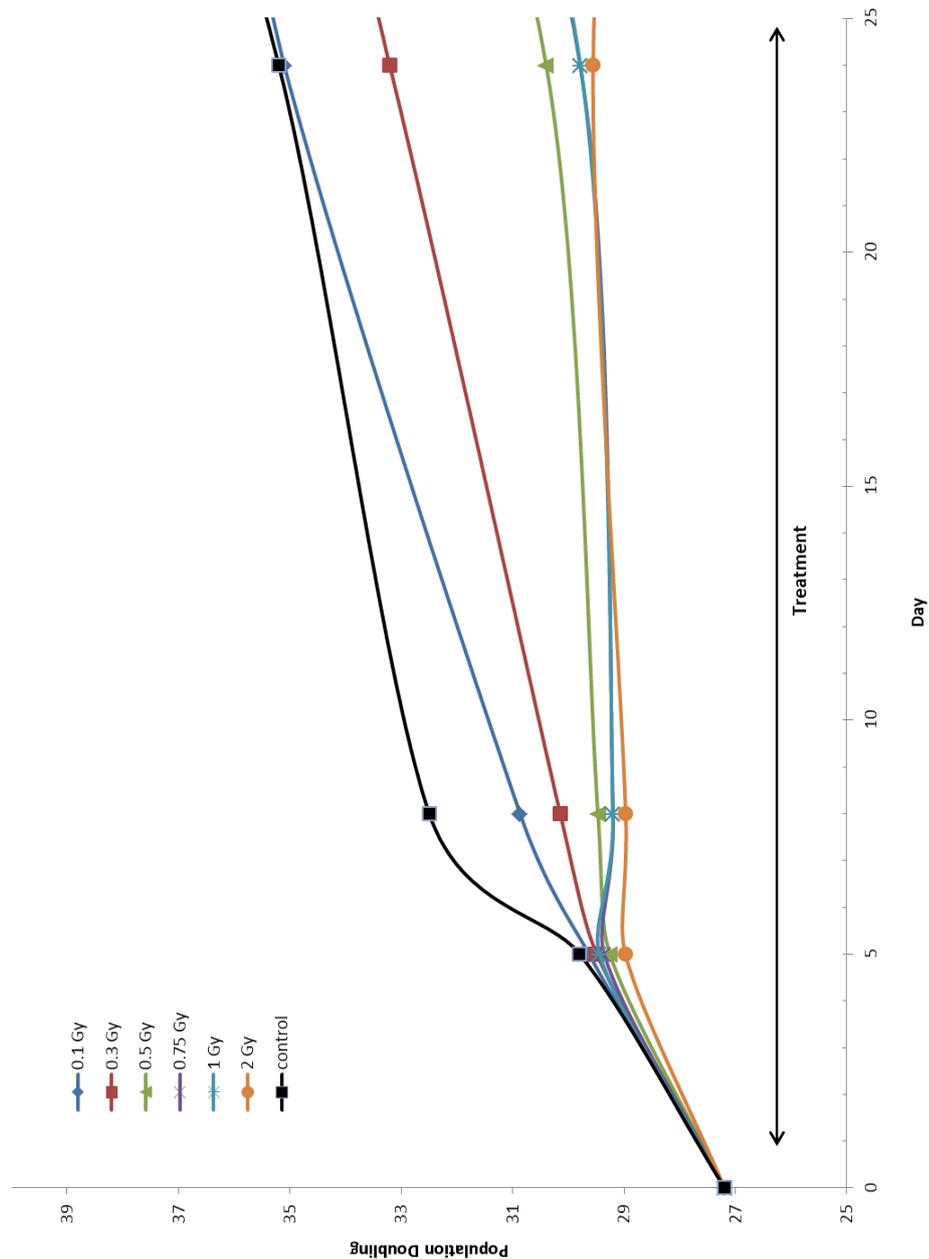


FIGURE 5.2 – Croissance cellulaire pendant un traitement radio-thérapeutique simulé de trois semaines. Des cellules NHDFs-F1MC ont été irradiées quotidiennement avec une dose de 0.1, 0.3, 0.5, 0.75, 1 et 2 Gy pendant trois semaines sauf le weekend. Chaque point correspond à un comptage cellulaire qui nous permet de calculer le doublement de population selon la formule 4.1.

Ainsi pendant la phase de traitement par radiation, nous pouvons observer une croissance altérée des cellules qui sont irradiées avec une dose quotidienne de 0.1 Gy et 0.3 Gy. En effet celles-ci présentent un ralentissement de la croissance. Pour les cellules irradiées avec une dose de 0.5, 0.75, 1 et 2 Gy, la perturbation est d'autant plus importante puisque l'on observe un arrêt de la croissance, et ceci déjà après 4 jours de traitement.

Ainsi en conclusion de cette étude de la prolifération après un traitement plein champ à différentes doses, nous pouvons dire que pendant la phase de traitement pour l'ensemble des doses nous observons un effet sur la prolifération. Cet effet est d'autant plus important que la dose quotidienne est forte et cet effet est déjà présent pour les très faibles doses de l'ombre.

5.3 Étude du cycle cellulaire durant une radiothérapie simulée à différentes doses

Les résultats précédents sur la prolifération des cellules NHDFs après traitement radio-thérapeutique suggèrent un arrêt dans le cycle cellulaire. Pour vérifier cela, nous avons réalisé une étude du cycle cellulaire par cytométrie en flux sur des cellules NHDFs soumises à un traitement radio-thérapeutique simulé et pour différentes doses.

Ainsi des cellules NHDFs-F1MC ont étéensemencées dans des plaques 6 puits. Elles ont ensuite été exposées à une dose quotidienne de 0.1, 0.3, 0.5, 0.75, 1 et 2 Gy. Nous avons ensuite réalisé une étude du cycle 4 et 8 irradiations. L'analyse du cycle a été faite 24 heures après la dernière irradiation. Pour comparaison une étude du cycle sur cellule jeune en prolifération et sur cellule sénescence a été réalisée. L'ensemble des résultats sont regroupés dans le figure 5.3.

Après 4 jours de traitement, seules les cellules irradiées avec une dose de 1 et 2 Gy voient leur cycle impacté. En effet pour ces deux doses nous avons une augmentation des cellules en phase G1 et une diminution des cellules en phase S par rapport aux cellules contrôles. Après 8 jours de traitement, nous avons la même tendance avec un effet net à partir de 0.3 Gy et progressif avec la dose. Dans ce dernier cas cependant, en plus de l'augmentation des cellules en phase

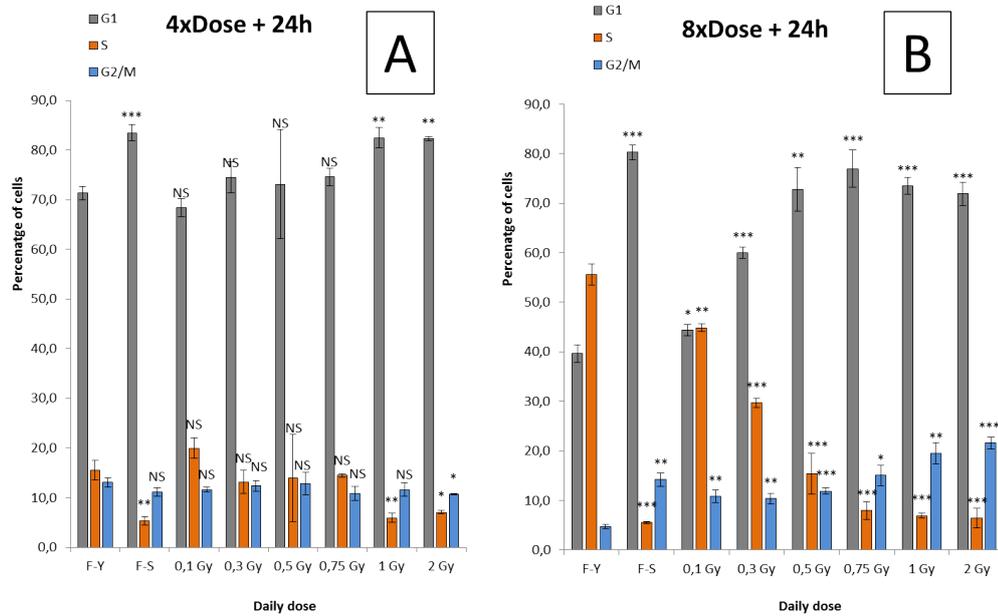


FIGURE 5.3 – Étude du cycle cellulaire pendant un traitement radio-thérapeutique simulé. Des cellules NHDFs-F1MC ont été irradiées quotidiennement par des doses de 0,1, 0,3, 0,5, 0,75, 1 et 2 Gy sauf le weekend. Des cellules NHDFs-F1MC jeunes (F-Y) sont cultivées en parallèle pour servir de contrôle négatif et des NHDFs-F1MC au plateau de sénescence (F-S) ont servi de contrôle positif. Une étude du cycle est réalisée après 4 jours d’irradiation (Panel A) et après 8 jours d’irradiation (Panel B). Chaque barre représente la moyenne et l’écart-type du pourcentage de cellules dans chacune des phases du cycle (G1, S et G2/M). Des tests statistiques selon la méthode de Student entre condition F-Y et chacune des conditions irradiées ont été réalisés ainsi qu’entre F-Y et F-S. NS ($p > 0.05$) : différence non significative, * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) : différence significative.

G1 et la diminution des cellules en phase S, nous avons une augmentation des cellules en phases G2.

Ainsi en conclusion, on voit apparaitre des effets sur le cycle cellulaire dès 4 jours de traitements pour une dose quotidienne de 1 et 2 Gy, et après 8 jours pour des doses quotidienne aussi faibles que 0.3 Gy qui est représentatives des doses reçues dans l'ombre. Cependant les effets sont plus nets à partir d'une dose quotidienne de 0.5 Gy. Dans l'ensemble les effets sont les mêmes, à savoir une diminution des cellules en phase S, une augmentation des cellules en phase G1 et une augmentation avec la dose des cellules en phase G2.

5.4 Sénescence induite par une radiothérapie simulée

Les résultats précédents sur l'arrêt dans le cycle cellulaire après un traitement radio-thérapeutique simulé nous montre que l'arrêt du cycle se produit principalement en phase G1. Or il est connu que les cellules sénescents sont arrêtées principalement en phase G1, nous avons donc réalisé une expérience dans le but de déterminer si les cellules soumises à un traitement simulé ont des caractéristiques supplémentaires de l'état de sénescence.

Ainsi, des cellules NHDFs-F1MC ont étéensemencées dans des plaques 6 puits. Elles ont ensuite été irradiées à différentes doses et ceci quotidiennement sauf les weekend pendant trois semaines. La dose quotidienne était de 0.1, 0.3, 0.5, 0.75, 1 ou 2 Gy. Pour évaluer la mise en place du phénotype sénescents nous avons réalisé une étude en cytométrie. L'intensité du C12FDG a été suivie au fur et à mesure des séances d'irradiation. Les résultats sont regroupés dans la figure 5.4.

Pour la dose 2 gy représentant une irradiation du PTV, il y a augmentation de l'activité SA- β -gal dès 4 irradiations, et une augmentation constante de cette activité au fur et à mesure des irradiations successives. Pour la dose de 1 Gy mimant la pénombre, l'augmentation de l'activité SA- β -gal est quasi-identique à celle du PTV. Pour la dose de 0.75 Gy mimant l'ombre proximale, l'activité SA- β -gal augmente significativement, mais de façon moins importante que pour

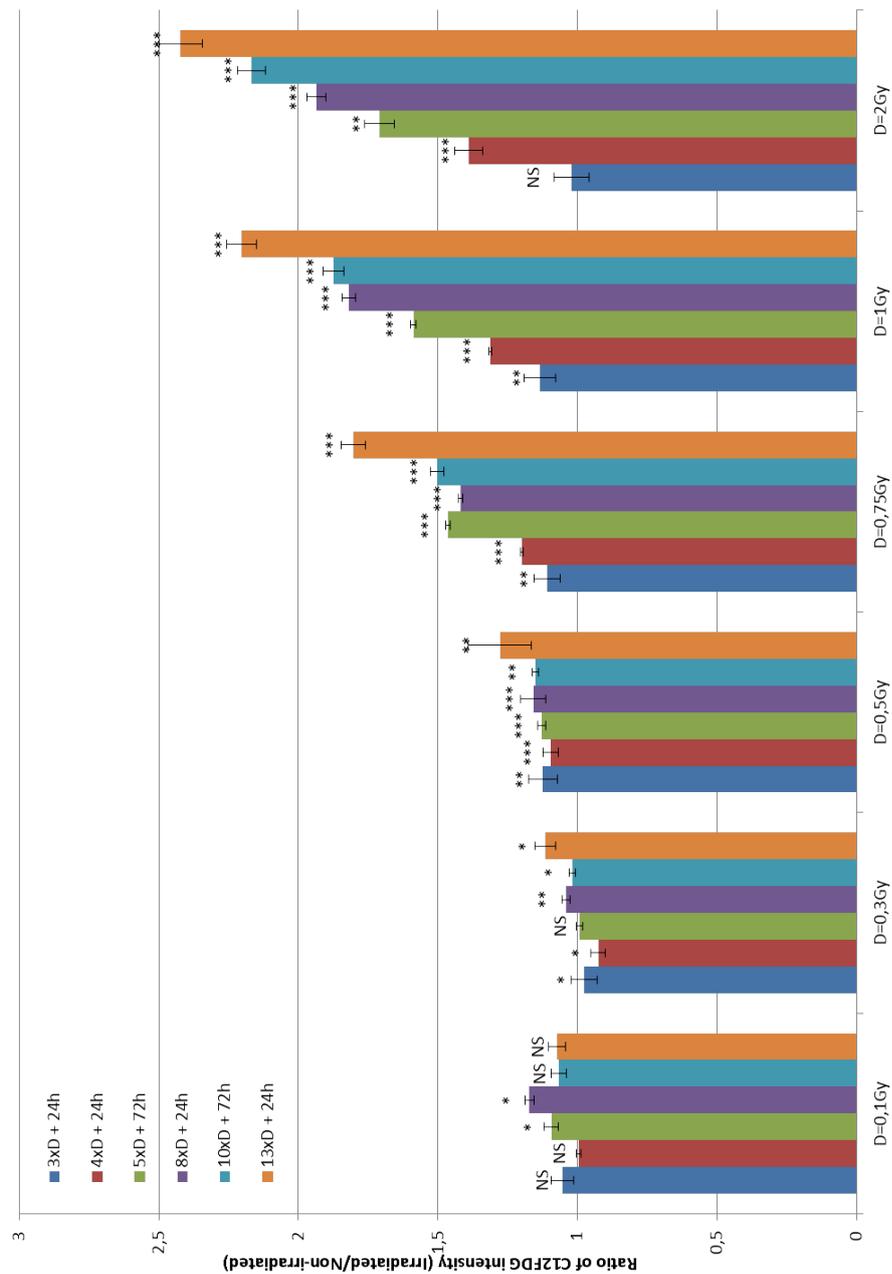


FIGURE 5.4 – Sénescence induite par un traitement radio-thérapeutique simulé sur des cellules NHDFs-F1MC. Pour évaluer l'induction de sénescence des cellules NHDFs-F1MC ont été irradiées à des doses quotidiennes de 0.1, 0.3, 0.5, 0.75, 1 et 2 Gy sauf le weekend. Nous avons réalisé une étude du marqueur de sénescence C12FDG par cytométrie en flux 24 ou 72h après 3, 4, 5, 8 10 et 13 irradiations. Les barres représentent la moyenne et l'écart-type du ratio de l'intensité du C12FDG des cellules irradiées sur les cellules non-irradiées. Des tests statistiques selon la méthode de Student entre condition non-irradiée et condition irradiée ont été réalisés. NS ($p > 0.05$) : différence non significative, * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) : différence significative.

1 ou 2 Gy. Enfin, pour les doses plus faibles, on n'observe pas d'induction biologiquement significative de sénescence (même si l'analyse statistique montre que les petites augmentations de l'intensité de fluorescence sont significatives, ceci du fait de la haute valeur statistique de la méthode par cytométrie en flux).

En conclusion, les doses représentatives de celles reçues dans la pénombre et l'ombre proximale sont susceptibles d'induire un état de sénescence lorsqu'elles sont quotidiennement répétées pendant 3 semaines.

Conclusion sur l'étude des faibles doses

Nous avons pu démontrer que des CSB et CDB sont générées même pour des faibles doses, que la croissance cellulaire est altérée et que l'on peut induire un phénotype sénescence et ceci même pour des faibles doses quotidiennes de 0.3 Gy. Cette étude préliminaire nous a donc motivé à faire une étude en plaçant physiquement des cellules en bordure du champ d'irradiation où la dose est plus faible qu'en plein champ d'un facteur 2, 4 ou même 10.

Étude des cassures de l'ADN et du devenir de cellules placées en bordure du champ d'irradiation

6.1 Évaluation de la quantité de CSB et CDB induites dans les cellules placées en bordure du champ d'irradiation

6.1.1 Pour une irradiation de 2Gy

Dans un premier temps nous avons évalué la quantité de cassures générées par une irradiation de 2 Gy. Pour ce faire des cellules NHDFs-F1MC ont été ensemencées dans des boites 96 puits. Les plaques ont été placées en partie en plein champ et en bordure du champ de manière à avoir des cellules jusqu'à 5 cm en dehors du champ (voir figure 4.10). De plus des cellules ont également été irradiées avec une dose plein champ de 5 Gy pour réaliser un contrôle positif. Après irradiation les cellules ont été fixées et les immunofluorescences dirigées contre les protéines XRCC1 et 53BP1 ont été réalisées. Les résultats sont regroupés dans la figure 6.2.

Pour les foyers 53BP1, nous avons une augmentation du nombre de foyers

par noyau d'environ 20 fois pour les cellules irradiées à 5 Gy par rapport aux cellules non-irradiées. Pour les cellules irradiées à 2 Gy, en plein champ le ratio est de 10 environ, alors que dans la pénombre le ratio chute à 4 pour revenir autour du niveau basal à 5 mm du PTV.

Pour les foyers XRCC1, nous avons une augmentation d'environ 15 pour les cellules irradiées à 5 Gy. De manière intéressante pour l'irradiation en bordure du champ il existe une augmentation du nombre de foyers par noyau quelque soit la zone d'irradiation (PTV, bordure proche et bordure lointaine) et cette augmentation reste autour de la même valeur, à savoir 7.

En conclusion de cette première expérience en bordure du champ d'irradiation, il est intéressant de noter que le traitement génère des foyers 53BP1 principalement dans le PTV et très peu en bordure, alors que des foyers XRCC1 sont générés en quantité équivalente quelque soit la zone et donc ceci indépendamment de la dose théorique déposée dans ces différentes zones.

6.1.2 Pour une irradiation à différentes doses

Les résultats précédents suggèrent que le nombre de cassures générées en bordure du champ d'irradiation ne dépendrait pas uniquement ou totalement de la dose supposée être déposée. Pour mieux investiguer ce point nous avons réalisé une expérience d'irradiation en bordure du champ à différentes doses appliquées dans le PTV et analysé la réponse en bordure du champ.

Ainsi des cellules NHDFs-F6MC1 ont étéensemencées dans des boîtes 96 puits. Ensuite les cellules ont été exposées à une dose dans le PTV de 0.5 Gy, 2 Gy et 4 Gy. De la même manière que précédemment les plaques ont été placées en partie en plein champ et en bordure du champ de manière à avoir des cellules jusqu'à 5 cm en dehors du champ (voir figure 4.10). Après irradiation les cellules ont été fixées et les immunofluorescences dirigées contre les protéines XRCC1 et 53BP1 ont été réalisées. Les résultats de cette expérience sont regroupés dans la figure 6.1 panels A et B.

Les données ont ensuite traitées afin de pour déterminer le nombre de cassures générées en fonction de la dose théoriquement déposée dans chaque zone. Pour ce faire en reprenant les données de la figure 4.11 qui indiquent le % de

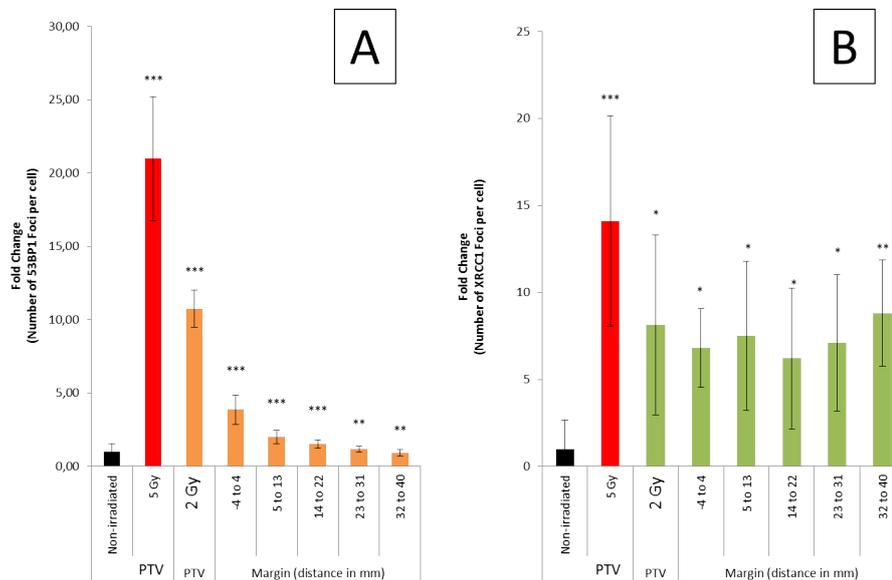


FIGURE 6.1 – Quantité de foyers 53BP1 (Panel A) et XRCC1 (Panel B) après irradiation de NHDFs-F1MC à 2 Gy en plein champ. Pour les études en bordure du champ d’irradiation les boîtes de culture 96 puits ont été placées systématiquement comme le montre la figure 4.10. Ainsi nous obtenons la quantité de dommages induits dans le PTV et en bordure du champ d’irradiation. En parallèle pour cette expérience nous avons à la fois des cellules contrôles non-irradiées et des cellules contrôles positives irradiées dans le PTV à 5Gy. La marge est indiquée en distance par rapport à la limite du champ lumineux considérée comme le point 0. Les barres représentent la moyenne et l’écart-type du ratio du nombre de foyers par cellule. Le ratio est celui du nombre de foyers obtenu pour les cellules irradiées sur le nombre de foyers obtenu pour les cellules non-irradiées. Des tests statistiques selon la méthode de Student entre condition non-irradiée et condition irradiée ont été réalisés. NS ($p > 0.05$) : différence non significative, * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) : différence significative.

dose déposée dans chaque colonne d'une plaque 96 puits, les doses théoriques déposées dans chaque colonne et pour chaque irradiation ont été calculées. Avec ces données nous avons construit les courbes donnant le nombre de foyers en fonction de la dose déposée pour chaque zone. Les résultats de cette analyse sont regroupés dans la figure 6.1 panels C et D.

On voit ainsi sur ces courbes que, pour les foyers 53BP1, leur nombre augmente de façon quasi-linéaire avec la dose pour des cellules placées dans le PTV et en bordure. Mais à dose équivalente, la quantité de CDB générée est plus faible en bordure que dans le PTV. Donc, l'irradiation des cellules placées dans la pénombre et dans l'ombre génère moins de CDB que théoriquement attendu au vu des doses reçues.

Inversement, pour les foyers XRCC1, leur nombre augmente aussi de façon quasi-linéaire avec la dose, que les cellules soient placées dans le PTV ou en marge. Néanmoins, en marge la quantité de CSB générées par l'irradiation est plus importante que dans le PTV, à dose équivalente.

Ainsi, dans les cellules placées dans la pénombre et dans l'ombre, l'irradiation génère plus de CSB et moins de CDB par rapport à ce qu'elle génère à dose équivalente dans le PTV.

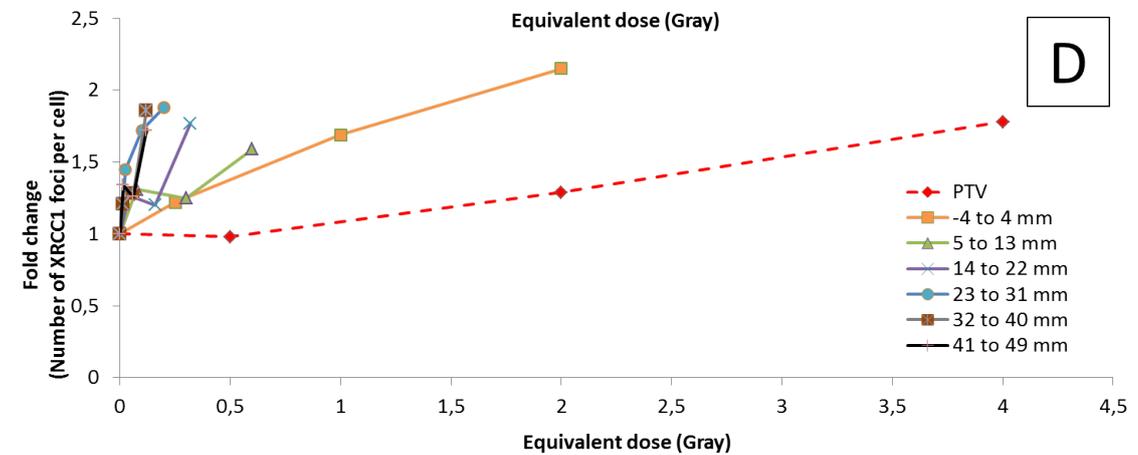
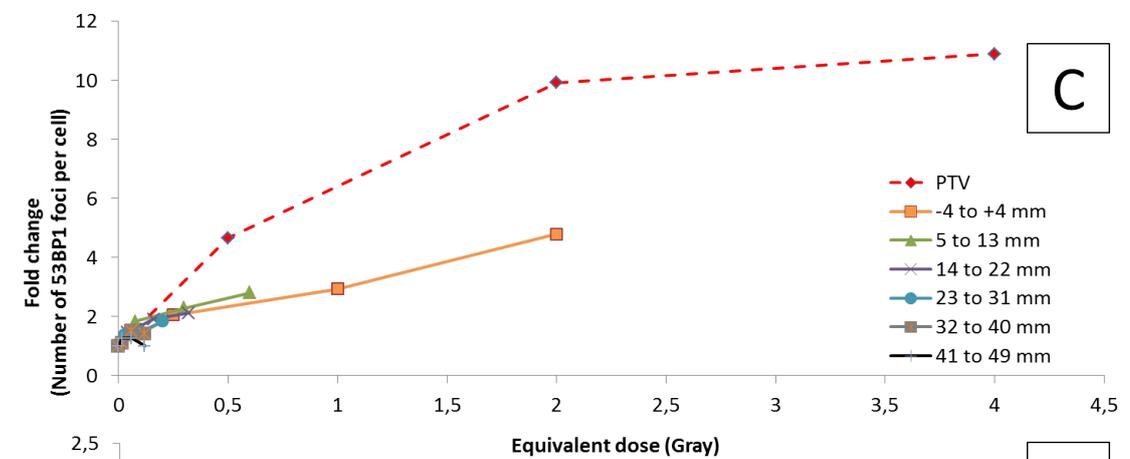
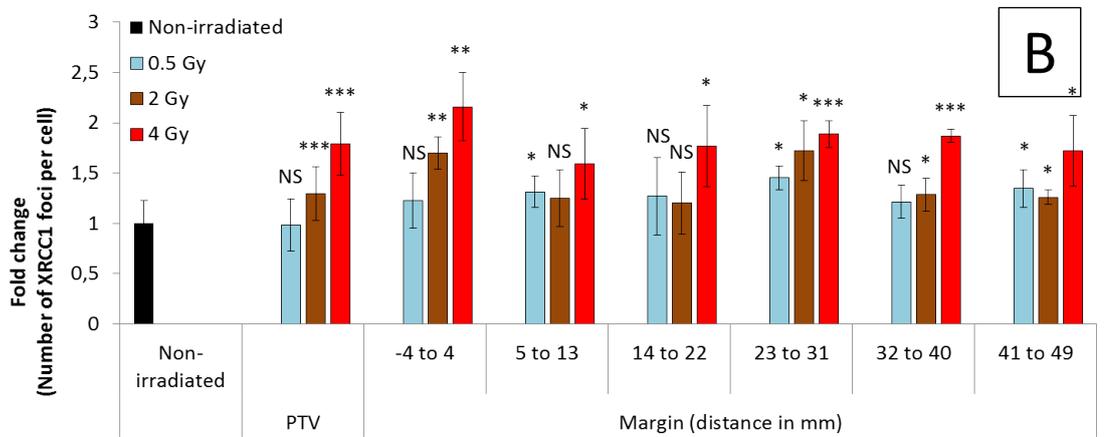
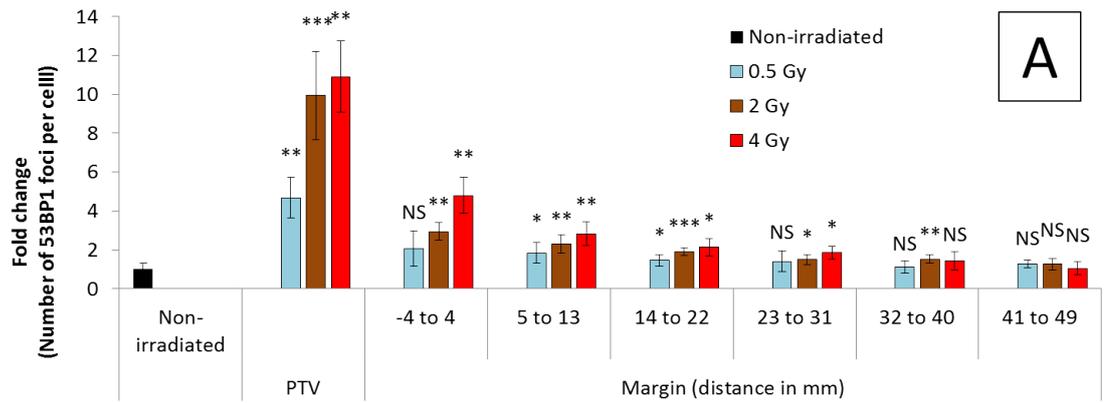


FIGURE 6.1 – Ratio du nombre moyen de foyers 53BP1 et XRCC1 (Panels A et B) après irradiation de NHDFs-F6MC1 à différentes doses dans le PTV et ratio du nombre moyen de foyers 53BP1 et XRCC1 en fonction de la dose théoriquement déposée pour chaque colonne d'une plaque 96 puits (calculée à partir des données de la figure 4.11) (Panels C et D).

- Panels A et B : Les barres représentent la moyenne et l'écart-type du ratio du nombre de foyers par cellule. Le ratio est celui du nombre de foyers obtenu pour les cellules irradiées sur le nombre de foyers obtenu pour les cellules non-irradiées. Des tests statistiques selon la méthode de Student entre condition non-irradiée et condition irradiée ont été réalisés. NS ($p > 0.05$) : différence non significative, * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) : différence significative.
- Panels C et D : Les points représentent le ratio du nombre moyen de foyers 53BP1 d'une part et XRCC1 d'autres part dans les cellules irradiées par rapport aux cellules non-irradiées en fonction de la dose théoriquement déposée.

6.2 Étude de la réparation des CSB et CDB après une irradiation en bordure du champ

Dans cette expérience, nous avons voulu déterminer si les cassures sont réparées au bout de 24h, c'est-à-dire entre deux séances de radiothérapie. En effet si ce n'est pas le cas les cassures pourraient s'accumuler au cours du traitement et donc cela pourrait avoir des conséquences sur le devenir cellulaire.

Des cellules NHDFs-F1MC ont étéensemencées dans des plaques 96 puits et exposées à une irradiation de 2 Gy dans le PTV. De la même manière que précédemment les plaques ont été placées en partie dans le PTV et en bordure du champ (voir figure 4.10). Après irradiation les cellules ont été remises à l'étuve et fixées à différents temps post-irradiation (20 min, 4h, 8h, 24h et 48h). Ensuite les immunofluorescences dirigées contre les protéines XRCC1 et 53BP1 ont été réalisées. Les résultats de cette expérience sont regroupés dans la figure 6.2.

Pour les foyers 53BP1, en plein champ nous avons une augmentation maximum d'environ 16 après 2h. Après 8h nous avons encore une augmentation d'environ 4, mais après 24h le niveau de cassures retombe à son niveau basal. Dans la zone de pénombre et d'ombre, nous retrouvons des cassures en nombre bien moins important que dans le PTV et celui-ci de même que pour le PTV, retombe à son niveau basal après 24h.

Pour les foyers XRCC1, nous confirmons que nous avons une réponse similaire quelque soit la zone irradiée avec une augmentation du nombre de cassures qui fluctuent autour de 6. Concernant la réparation, de manière intéressante, après 24h il reste encore un signal puisque le nombre de CSB dans les cellules irradiées est 3 fois plus important que dans les cellules non-irradiées. Après 48h, il n'y a plus de signal et le nombre de cassures est retombé à son niveau basal.

Nous pouvons donc conclure de cette expérience que contrairement au CDB qui sont toutes réparées après 24h, il persiste des foyers XRCC1 après 24h, ce qui suggère que les CSB ne sont pas toutes réparées après 24h et pourraient donc s'accumuler au fil des séances d'irradiation du traitement, que ce soit dans le PTV ou en marge.

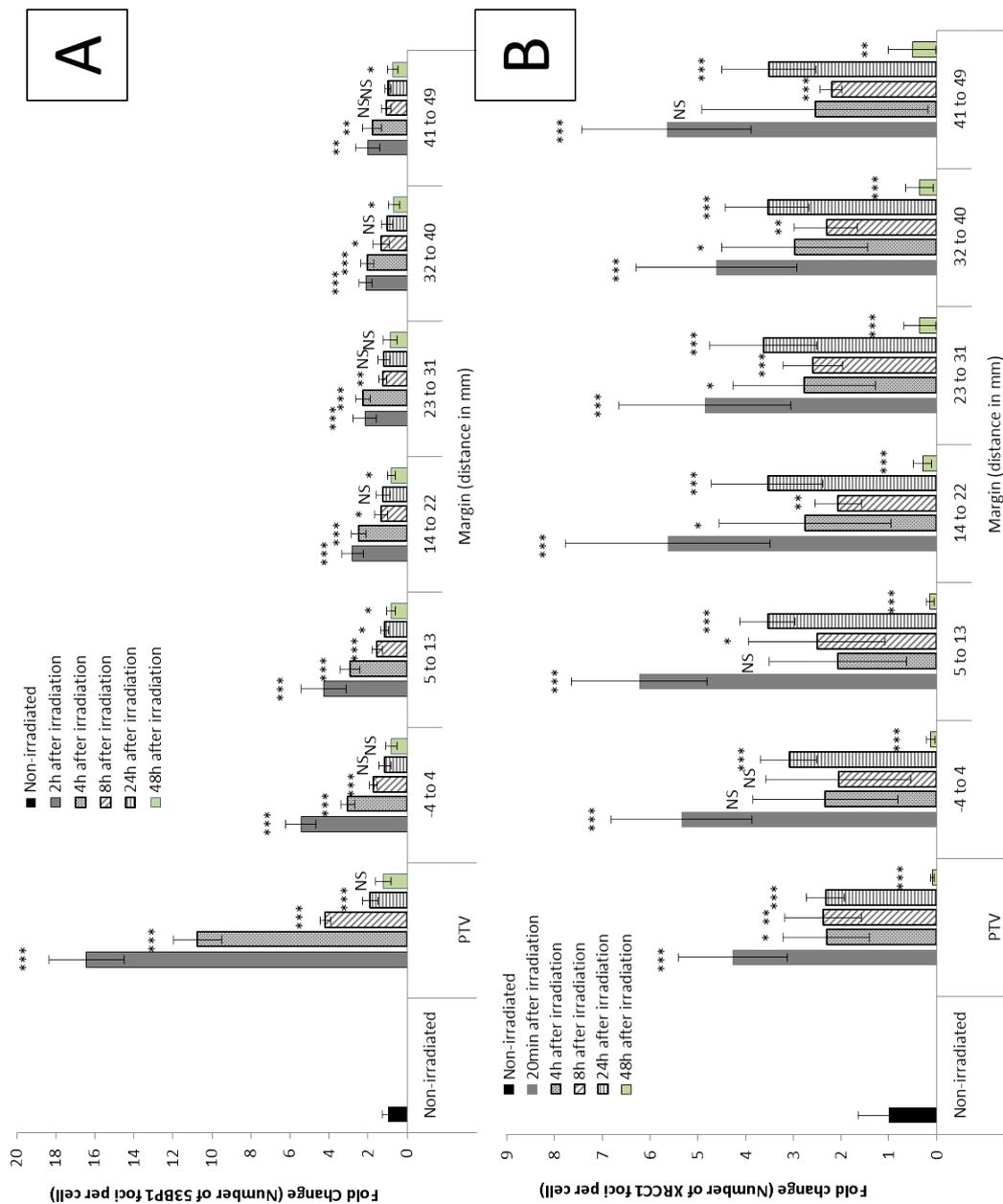


FIGURE 6.2 – Étude de la réparation des CSBs et CDBs après une irradiation en bordure du champ de NHDFs-F1MC soumise à une dose de 2 Gy dans le PTV. Les cellules ont été fixées post-irradiation après 2, 4, 8, 24 et 48h. Les cellules contrôles non-irradiées ont été fixées 20 min après remise dans l'incubateur. Les barres représentent la moyenne et l'écart-type du ratio du nombre de foyers par cellule. Le ratio est celui du nombre de foyers obtenu pour les cellules irradiées sur le nombre de foyers obtenu pour les cellules non-irradiées. Des tests statistiques selon la méthode de Student entre condition non-irradiée et condition irradiée ont été réalisés. NS ($p > 0.05$) : différence non significative, * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) : différence significative.

6.3 Étude de l'influence d'une radiothérapie simulée sur la croissance cellulaire dans le PTV et en bordure du champ

Nous avons vu précédemment que les cellules accumulent en bordure du champ principalement des CSB et dans le PTV des CDB et des CSB. Cette différence pourrait influencer le devenir cellulaire de manière différente. Dans un premier temps nous avons voulu déterminer l'impact de cette différence sur la croissance cellulaire dans le PTV et en bordure du champ d'irradiation au cours d'un traitement radio-thérapeutique simulé d'une semaine.

Pour ce faire, des cellules NHDFs-F1MC ont étéensemencées dans des plaques 96 puits. Elles ont ensuite été exposées à une irradiation quotidienne de 2 Gy dans le PTV pendant quatre jours. De la même manière que précédemment les plaques sont placées en partie dans le PTV et en bordure du champ (voir figure 4.10). Pour suivre la croissance des cellules, une plaque a été fixée 24h après chaque irradiation et le nombre de cellules dans les différents zones a été comptabilisé de manière automatisé par microscopie haut-contenu et à partir du logiciel Columbus. Les résultats de cette expérience sont regroupés dans la figure 6.3.

La figure 6.3 nous montre une croissance normale pour les cellules contrôle non irradiées avec environ 1 doublement par jour. En revanche en plein champ la croissance est clairement altérée. En effet la population cellulaire n'augmente quasiment pas, et ceci dès la 1ère irradiation. Dans les deux premières zones de la bordure la croissance cellulaire se trouve également altérée surtout après 3x2 Gy. Enfin dans les trois zones les plus lointaines la croissance est aussi ralentie, mais de façon beaucoup moins importante et uniquement après 4 irradiations. De plus, nous n'observons pas de diminution importante du nombre de cellules au cours des irradiations, donc pas de mort massive.

En conclusion de cette expérience, les cellules irradiées en plein champ ne prolifèrent pas mais ne subissent pas de mort massive, les cellules en bordure proche jusqu'à 13 mm du plein champ ont une prolifération clairement altérée et enfin les cellules qui se trouvent en bordure lointaine à plus de 14 mm voient

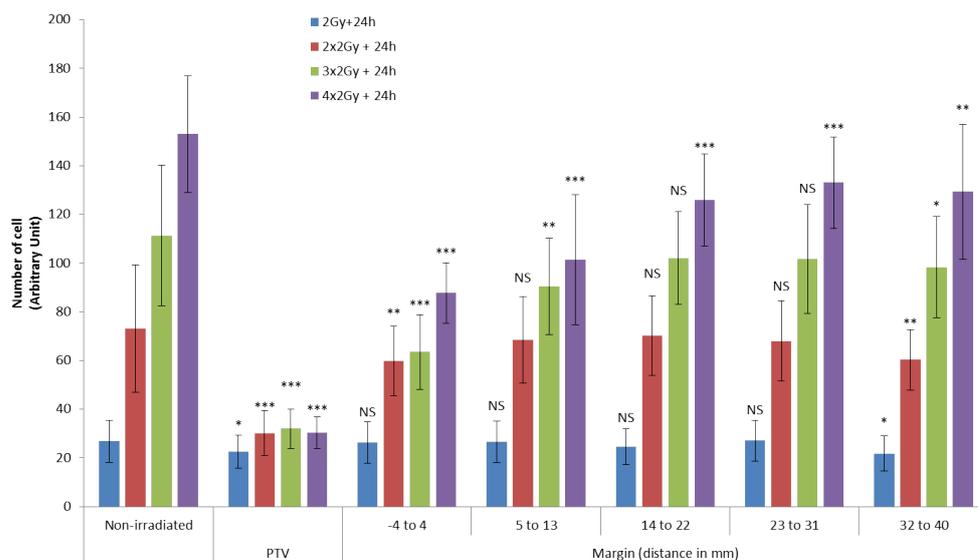


FIGURE 6.3 – Étude de l'influence d'un traitement radiothérapeutique simulé sur la croissance cellulaire en bordure du champ. Les barres représentent la moyenne et l'écart-type du nombre de noyaux par colonne de puits (unité arbitraire). Des tests statistiques selon la méthode de Student entre condition non-irradiée et condition irradiée ont été réalisés. NS ($p > 0.05$) : différence non significative, * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) : différence significative.

leur prolifération faiblement altérée.

Ces résultats pourraient suggérer que les NHDFs rentrent dans un état de sénescence au fur et à mesure des irradiations, qu'elles soient localisées dans le PTV ou en marge.

6.4 Étude de l'induction de sénescence par une radiothérapie simulée dans le PTV et en bordure du champ d'irradiation

Pour évaluer si les cellules qui reçoivent un traitement radio-thérapeutique simulé entrent en partie dans un état de sénescence, nous avons ensemencé des cellules NHDFs-F1MC dans des plaques 6 puits. Elles ont ensuite été exposées

à une dose quotidienne de 2 Gy pendant 3 semaines. Nous avons choisi ici d'utiliser des plaques 6 puits pour pouvoir disposer de suffisamment de cellules pour faire en parallèle des extractions de protéines et l'analyse des cassures de l'ADN. Ainsi, nous n'avons distingué dans cette expérience seulement trois zones, à savoir la zone plein champ, la zone de bordure proche, et la zone de bordure lointaine. Pour évaluer la mise en place du phénotype sénescence nous avons réalisé une étude en cytométrie. Ainsi nous nous sommes intéressés à trois paramètres qui sont le substrat C12FDG ainsi que la taille et la granularité des cellules. Les résultats sont regroupés dans la figure 6.3.

Concernant l'intensité du marqueur C12FDG, on voit en plein champ une augmentation progressive au fur et à mesure des séances d'irradiation et ce jusqu'à 15x2 Gy, avec un ratio qui atteint la valeur de 3.5. Dans la zone de bordure proche, on voit une augmentation jusqu'à 7x2 Gy, ensuite l'intensité du signal se stabilise et le ratio fluctue autour de 1.5. Enfin dans la zone de bordure lointaine on observe qu'une légère augmentation du ratio avec une valeur du ratio qui fluctue autour de 1.

Pour l'analyse de la taille et de la granularité, nous avons d'abord analysé des NHDFs-F1MC sénescence en comparaison de NHDFs-F1MC proliférants de façon à fixer la fenêtre de taille et de granularité représentative de l'état sénescence. Concernant le pourcentage de cellules les plus grosses et les plus granulaires, les cellules jeunes contrôles en possèdent environ 10 % et les cellules sénescence environ 30 %. Dans la zone plein champ nous voyons une augmentation du pourcentage déjà des 2x2 Gy, et celui-ci atteint un maximum dès 4x2 Gy avec un pourcentage autour de 40 %. Ce pourcentage diminue à partir de 7x2 Gy pour atteindre une valeur autour de 20 % après 15x2 Gy. En revanche dans la zone de bordure proche nous avons une augmentation progressive du pourcentage de cellules grosses et granulaires, avec une valeur autour de 15% la première semaine d'irradiation, de 20 % la deuxième semaine pour enfin atteindre une valeur autour de 35 %. Dans la bordure lointaine on remarque également une augmentation du pourcentage de cellules grosses et granulaires. En effet même si le pourcentage fluctue il est supérieur au niveau contrôle et atteint après 15x2 Gy une valeur autour de 20 %.

On a donc au cours des irradiations :

- Dans le PTV, une induction de sénescence (SA- β -galactosidase, taille, granularité) qui atteint son maximum au bout d'une semaine d'irradiation, suivie d'une mortalité cellulaire associée à une activité SA- β -Gal toujours croissante.
- Dans la bordure, une induction de sénescence pendant la 1ère semaine puis une stabilisation de cet état pendant les 3 semaines, avec une activité SA- β -Gal plus faible que dans le PTV et surtout sans mortalité apparente.

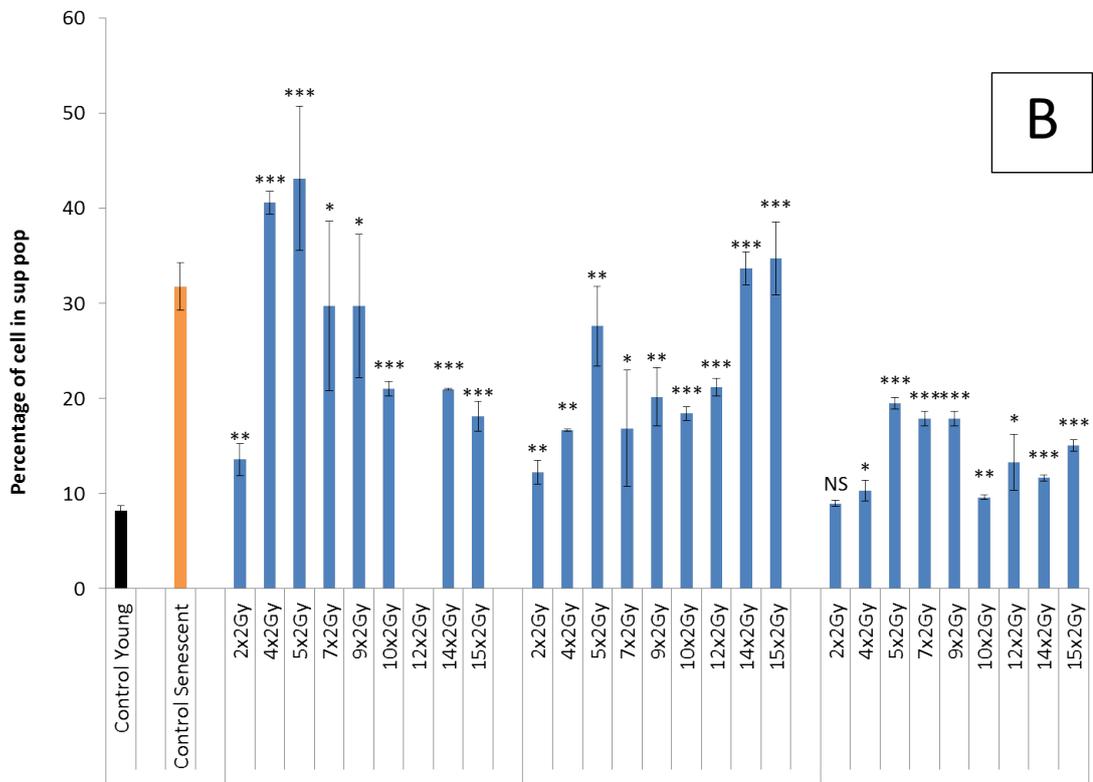
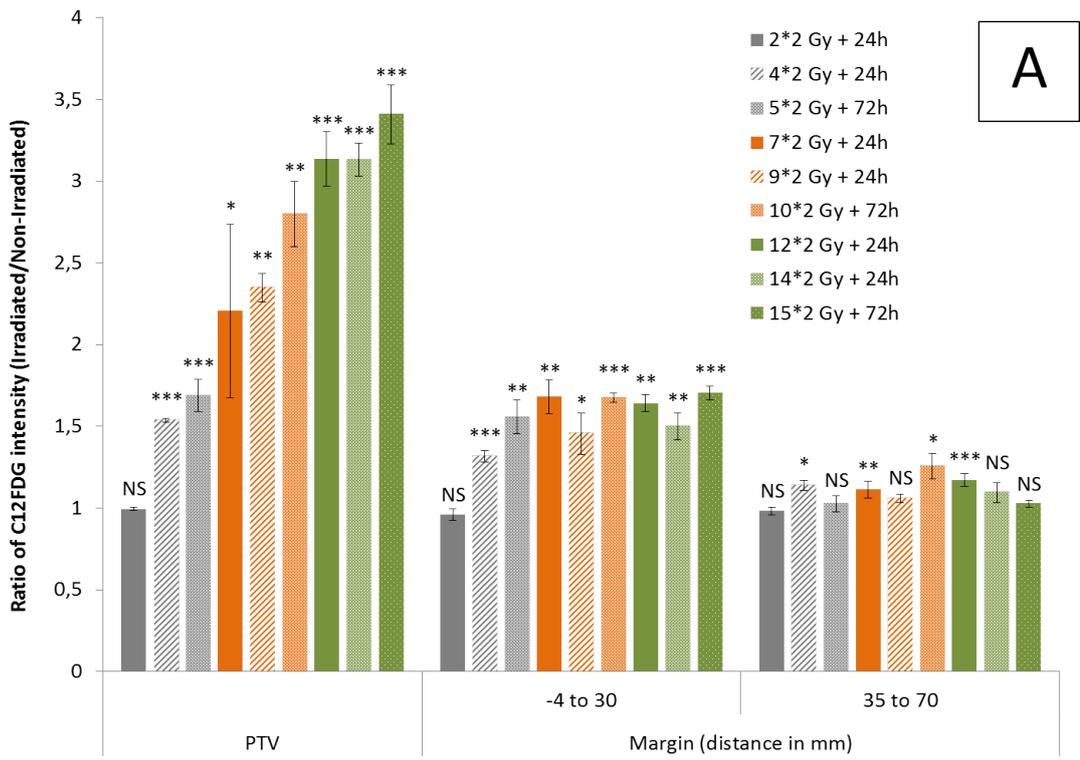


FIGURE 6.3 – Étude de l'induction de sénescence par un traitement par radiation en bordure du champ d'irradiation. Pour ce faire des NHDFs-F1MC ont été ensemencées dans des plaques 6 puits et irradiées en bordure du champ d'irradiation avec des doses quotidiennes dans le PTV de 2 Gy et ceci pendant trois semaines sauf les weekends.

- Panel A : Analyse de l'activité SA- β -Gal par cytométrie en flux à l'aide du substrat C12FDG. Les barres représentent la moyenne et l'écart-type du ratio de l'intensité du C12FDG des cellules irradiées sur les cellules non-irradiées.
- Panel B : Analyse de la taille et de la granularité par cytométrie en flux. Les barres représentent la moyenne et l'écart-type du pourcentage moyen de cellules les plus grosses et les plus granulaires dans la zone P2 ("sup pop") selon la méthode décrite dans la figure 4.8.

Des tests statistiques selon la méthode de Student entre condition non-irradiée et condition irradiée ont été réalisés. NS ($p > 0.05$) : différence non significative, * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) : différence significative.

6.5 Étude de l'influence d'une radiothérapie simulée sur l'accumulation des CSB et CDB dans le PTV et en bordure du champ

Pour évaluer l'influence d'un traitement radio-thérapeutique simulé sur l'accumulation des CSB et CDB en bordure du champ et donc évaluer et suivre la persistance des foyers en parallèle de l'induction de sénescence, les cellules irradiées de l'expérience précédente ont été récupérées 4h heures après la dernière irradiation, réensemencées en plaque 96 puits (pour utiliser la technique HCS) et fixées 24h ou 72h après. Nous avons réalisé ceci après 4,5,8,10,13 et 14 fois 2 Gy et des immunofluorescences dirigées contre XRCC1 et 53BP1 ont été réalisées. L'ensemble des résultats sont regroupés dans la figure 6.3. Pour ces expériences nous avons à la fois analysé le ratio du nombre de foyers moyen par cellule, mais aussi le ratio de l'intensité moyenne de ces foyers. En effet une augmentation de l'intensité des foyers pourrait être le signe de l'accumulation de protéines au fur et à mesure du temps, donc de la persistance des foyers.

Pour 53BP1, les résultats nous montrent une accumulation d'un facteur 5 environ du nombre de foyers avec les irradiations dans le PTV, en revanche on ne retrouve rien en bordure ou l'augmentation est légèrement supérieure à 1. En ce qui concerne l'intensité moyenne des foyers on observe une augmentation dès 4x2 Gy pour le plein champ et dès 5x2 Gy pour la bordure proche. Cependant sur ces derniers résultats on observe des fluctuations du signal qui suggèrent qu'il n'y a pas de réelle persistance des foyers 53BP1.

En revanche, pour XRCC1 les résultats nous montrent une augmentation du nombre de foyers de 5 en plein champ et aussi une augmentation de 3 en bordure proche, et ceci déjà dès 4x2 Gy. Il existe une augmentation également en bordure lointaine mais celle-ci est très faible et souvent non significative. Il ne semble pas y avoir d'augmentation de ce ratio au fur et à mesure des séances d'irradiation. En effet quelle que soit la zone le point 4x2 Gy semble déjà donner la tendance pour la suite, ainsi en plein champ l'augmentation du nombre de foyers fluctue autour de 5, en bordure proche celle-ci fluctue autour de 3 et en bordure lointaine autour de 1. Le résultat n'est pas le même lorsque l'on regarde l'intensité moyenne de

ces spots. En effet et ceci de manière intéressante, dans le PTV en plus d'observer une augmentation significative du ratio des intensités déjà à partir de 4x2 Gy, la valeur continue d'augmenter jusqu'à la fin du traitement. Dans la marge proximale on observe une augmentation biologiquement significative à partir de 8x2 Gy, et le signal fluctue autour de cette valeur jusqu'à la fin du traitement tout en restant biologiquement significatif.

En conclusion, pour les cellules qui survivent aux différentes séances d'irradiation nous observons une accumulation significative des foyers XRCC1 en plein champ et en bordure proche. En plus de l'accumulation en nombre de foyers, ceux-ci deviennent de plus en plus intenses avec un maximum d'intensité observé dès 8x2 Gy. En revanche on observe une accumulation des foyers dans le PTV mais pas en bordure pour la protéine 53BP1.

Conclusion sur la radiothérapie simulée en bordure du champ d'irradiation

Ainsi en conclusion de ces 3 expériences (études sur la croissance, sur la sénescence et sur les cassures) réalisées dans le même temps et avec les mêmes cellules soumises au même traitement radio-thérapeutique simulé nous pouvons mettre en avant deux points principaux :

- Dans le PTV, la sénescence et ce qui semble être de la mortalité s'accompagnent d'une accumulation de CDB et de CSB.
- En revanche dans la marge, nous mettons en évidence un phénotype sénéscent mais cette fois-ci sans mortalité apparente, et cette sénescence n'est accompagnée que d'une accumulation de CSB.

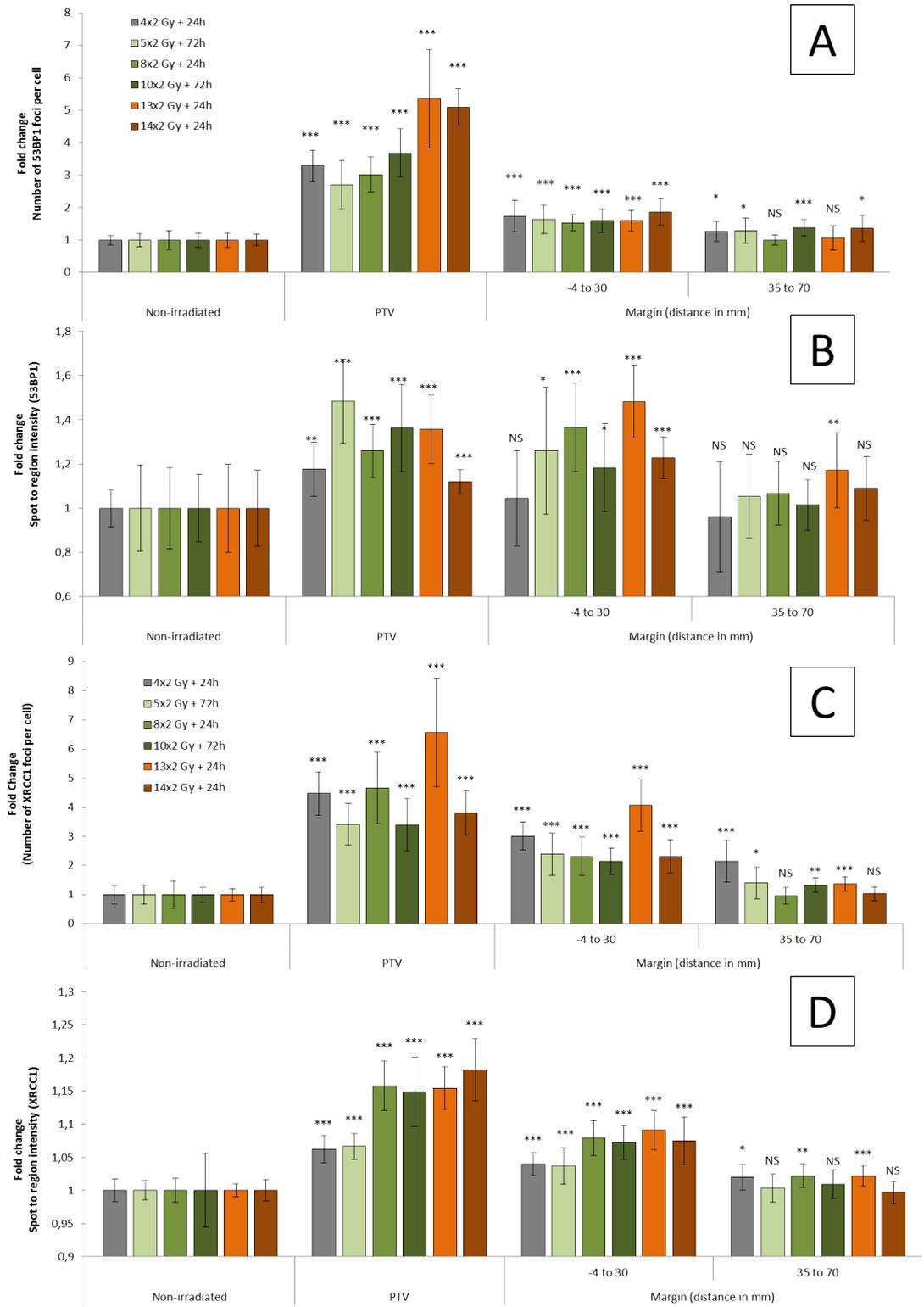


FIGURE 6.3 – Étude de l'influence d'un traitement radio-thérapeutique simulé sur l'accumulation des foyers 53BP1 et XRCC1 en bordure du champ.

- Panels A et C : Suivi de l'accumulation du nombre de foyers 53BP1 (Panel A) et XRCC1 (Panel C). Les barres représentent la moyenne et l'écart-type du ratio du nombre de foyers par cellule. Le ratio est celui du nombre de foyers obtenu pour les cellules irradiées sur le nombre de foyers obtenu pour les cellules non-irradiées.
- Panels B et D : Suivi de l'évolution de l'intensité des foyers 53BP1 (Panel B) et XRCC1 (Panel D). Les barres représentent la moyenne et l'écart-type du ratio de l'intensité moyenne des foyers par cellule. Le ratio est celui de l'intensité obtenue pour les cellules irradiées sur l'intensité obtenue pour les cellules non-irradiées.

Des tests statistiques selon la méthode de Student entre condition non-irradiée et condition irradiée ont été réalisés. NS ($p > 0.05$) : différence non significative, * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) : différence significative.

Conclusion/Discussion de l'étude expérimentale du rôle de la sénescence et des cassures simple-brin de l'ADN dans la survenue de sarcomes secondaires en territoire irradié

Les seconds cancers survenant en territoire irradié sont un réel problème dans le traitement du cancer par radiothérapie. En effet en plus d'être l'effet secondaire le plus grave, ils sont de très mauvais pronostic. Avec l'amélioration des techniques de radiothérapie et l'augmentation des chances de survie à long termes des patients, la prévalence de ces seconds cancers pourrait atteindre les 30 %. Ainsi il paraît essentiel d'améliorer la compréhension des mécanismes mis en jeu dans le développement de ces derniers.

Les principaux objectifs de mon projet de thèse dans cette partie expérimentale était :

1- D'analyser les cassures simple-brin et cassures double-brin subies par des fibroblastes normaux de derme humain quand ils sont irradiés en plein champ

ou en bordure de champ.

2- D'analyser si les cassures subies sont réparées ou persistantes et d'en analyser les conséquences sur le devenir cellulaire en terme de progression dans le cycle cellulaire et entrée en sénescence.

Des cellules placées en bordure d'un champ d'irradiation subissent des cassures simple-brin :

Nous avons montré pendant ce travail qu'une dose de 2 Gy dans le PTV induit des CSB (foyers XRCC1) dans les cellules dans toutes les zones considérées, à savoir plein champ, bordure proche et lointaine. En revanche on ne génère quasiment pas de CDB (foyers 53BP1) en bordure (figure 6.1). De plus nous avons montré que dans les cellules placées dans la pénombre et dans l'ombre, l'irradiation génère plus de CSB (foyers XRCC1) et moins de CDB (foyers 53BP1) par rapport à ce qu'elle génère à dose équivalente dans le PTV. Ce résultat très original n'est pas du tout attendu. En effet il est décrit dans la littérature que la quantité de CSB et CDB est directement liée à la dose. Or nos résultats montrent que pour les foyers XRCC1 marqueurs des CSB on observe une hypersensibilité à la dose en bordure et que pour les foyers 53BP1 marqueurs des CDB on observe une hyposensibilité à la dose (figure 6.1).

Ces résultats, de part leur originalité nécessitent d'être confirmés par une autre méthode de détection des cassures. Une étude préliminaire par essais comètes récemment réalisées dans l'équipe confirment qu'il se génère autant de CSB dans la pénombre que dans l'ombre (jusqu'à 5 cm en dehors du champ d'irradiation) que dans le PTV après une irradiation de 2 Gy.

Maintenant, si ce résultat expérimental semble confirmé, il subsiste de grandes interrogations sur la genèse d'un point de vue physico-chimique de ces cassures en bordure du champ. Plusieurs questions peuvent être posées :

- quelle est l'origine exacte de la dose reçue en bordure du champ d'irradiation, et quel est le type et l'énergie des particules qui la dépose ?
- Pourrait-on être en présence d'un spectre d'énergie des particules différents selon que l'on se trouve dans le PTV ou en bordure ?

A ce propos l'étude réalisé par CHOFOR et al. 2012 est riche en informa-

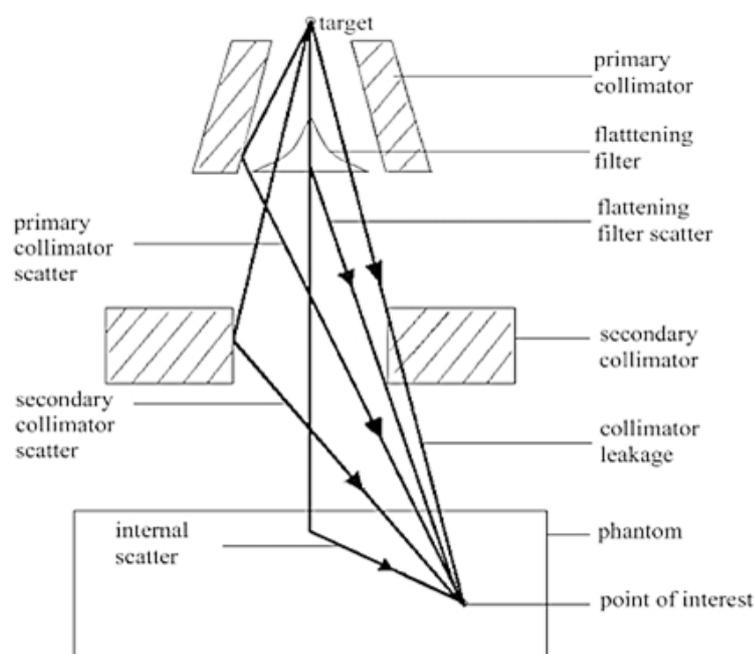


FIGURE 7.1 – Origine de la dose reçue en bordure du champ d'irradiation lors d'un traitement par LINAC d'après CHOFOUR et al. 2012.

tions à ce propos. En effet ils ont montré que la diffusion des photons à l'intérieur du patient principalement par effet Compton est la principale source de dose dans la région bordure de champ (voir 7.1). La diffusion dans le patient et donc la dose déposée en bordure du champ dépend de l'énergie du faisceau, de la taille du champ et de la distance par rapport au centre du champ. A ce propos de manière intéressante ils ont montré également un dépôt de dose jusqu'à 5 cm en dehors du champ d'irradiation. De plus ils ont montré que plus on s'éloigne de la bordure du champ plus l'énergie des photons diffusés est faible. On peut retenir ici que l'énergie des photons générés par la diffusion à l'intérieur du patient ont une énergie proche de 500 keV (voir 7.2).

Ainsi dans le cadre de nos expériences et de la problématique des sarcomes en territoire irradiée, la diffusion dans le patient pourrait être à l'origine des cassures simple-brin observées en bordure du champ d'irradiation. En effet dans la mesure où des photons sont diffusés dans le patient

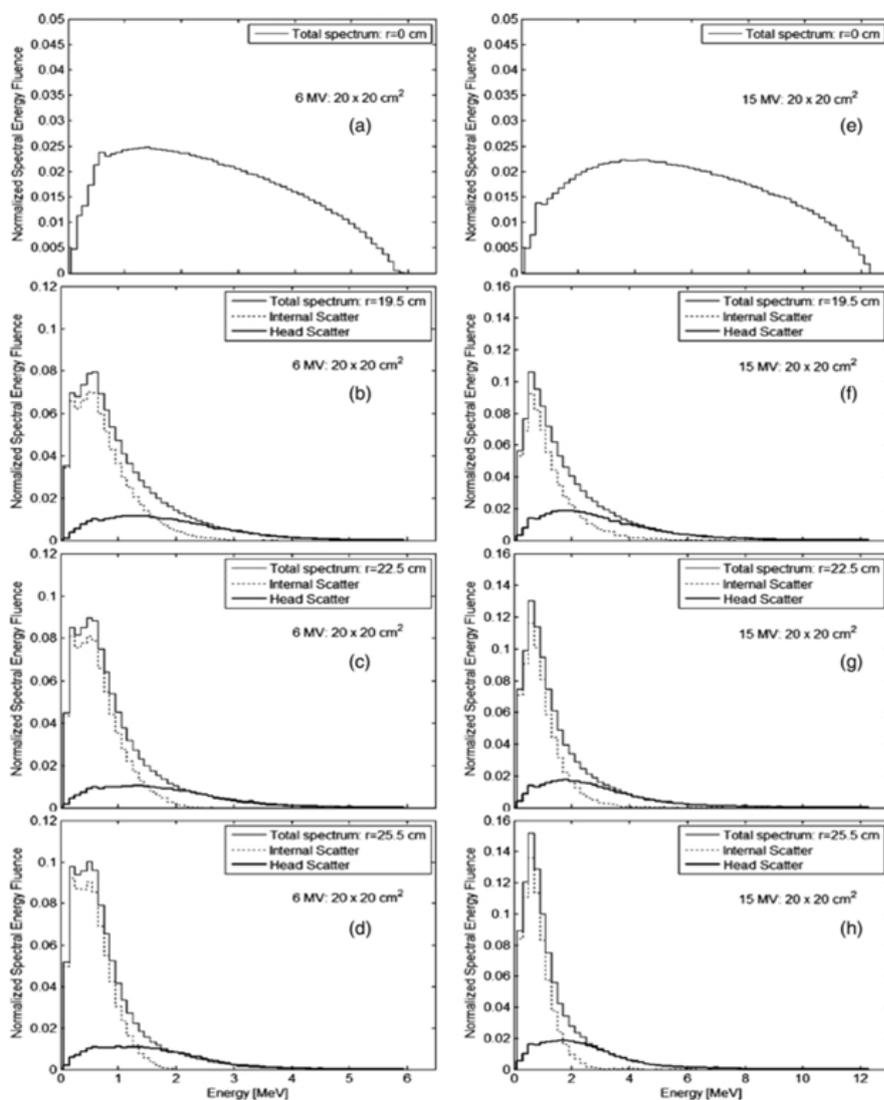


FIGURE 7.2 – Spectres en énergie des photons pour des faisceaux de 6 MV et 15 MV à 10 cm de profondeur dans l'eau pour un champ $20 \times 20 \text{ m}^2$ et une distance-surface-source = 100 cm d'après CHOFOR et al. 2012. r définie la position en bordure du champ d'irradiation pour laquelle le spectre est calculé par rapport au centre du champ d'irradiation ($r=0$).

ces derniers peuvent déposer leur énergie et créer des dommages tout le long de leur parcours. De plus l'étude montre ici que de la dose est déposée même 5 cm en dehors du champ d'irradiation, ce qui est cohérent avec le fait que l'on trouve dans nos expériences des dommages à l'ADN jusqu'à 5 cm (distance la plus importante que l'on a expérimentée). De plus l'énergie des photons produit par diffusion dans le patient étant plus faible que l'énergie moyenne des photons qui arrivent en plein champ pourrait expliquer le fait que l'on observe principalement des CSB et quasiment pas de CDB.

Dans ce cadre par exemple on peut se demander si la proportion entre effet direct des RI et effet indirect des RI via les espèces réactives de l'oxygène et les radicaux libres est différent du fait de l'énergie plus faible des photons. Autrement dit il serait intéressant de réaliser des expériences sous anti-oxydants pour observer si oui ou non dans la zone de bordure de champ les CSB ont pour origine principale le stress oxydant.

Dans une autre mesure, l'utilisation des neutrons pourrait poser des problèmes de cancers secondaires. Le suivi de patient traité par faisceau de neutron a montré une incidence 111 fois supérieur à la population normale et 15 fois supérieur à une population comparable traitée par faisceaux de photons. (MACDOUGALL, KERR et DUNCAN 2006 ; HALL 1996).

Les foyers XRCC1 s'accumulent en bordure du champ au fur et à mesure d'un traitement radio-thérapeutique simulé :

Nous avons également regardé la capacité pour ces foyers à se résorber sur une durée de 48h. Ce que nous observons c'est qu'il reste des foyers XRCC1 après 24h, alors qu'il n'y a plus de foyers 53BP1 après ces mêmes 24h. Ceci est un résultat aussi original puisque il est plutôt décrit dans la littérature que les CSB se réparent beaucoup plus rapidement que les CDB.

De manière très intéressante nous avons montré également qu'un certain nombre de foyers XRCC1 s'accumulent en plein champ et en bordure proche lorsque l'on réalise une succession de séances quotidiennes de 2 Gy. Cette accumulation est déjà présente après 4 jours de traitement, ce qui suggère que

ces foyers deviennent persistants, avec un recrutement continu de XRCC1. De plus l'intensité moyenne de ces foyers tend vers l'augmentation tout au long du traitement. Ce résultat est d'autant plus intéressant qu'il n'existe quasiment pas d'accumulation des foyers 53BP1.

D'ailleurs mon équipe travaille également sur des kératinocytes sénescents et il a été montré que ceux-ci accumulent des foyers XRCC1 anormalement gros. Il a été également montré que cette accumulation était due à la dégradation de PARP1, à l'absence de recrutement de CK2, à l'absence de phosphorylation de XRCC1 et à l'absence du recrutement de PNPK (NASSOUR et al. 2016). Ainsi les foyers n'ont pas la capacité à se résorber et les cassures ne se réparent pas.

L'hypothèse ici est que les irradiations pourraient dégrader PARP1 au cours des séances successives. D'ailleurs des premiers résultats de Western-Blot réalisés par l'équipe avec les extraits protéiques que j'ai réalisés en parallèle des marquages de sénescences et de l'étude de l'accumulation des cassures vont dans ce sens puisque après 2*2 Gy et 9*2 Gy il y a une dégradation de PARP1 dans le PTV et dans la zone de bordure du champ.

Dans les kératinocytes sénescents, la diminution de PARP1 est transcriptionnelle et est induite par le stress oxydant associé. Il faudrait regarder si on a une diminution transcriptionnelle de PARP1 aussi dans le cadre des traitements en bordure du champ et si cette diminution est également induite par un stress oxydant généré par les RI. Ainsi les expériences que l'on prévoit de faire dans ce cadre viendraient utiliser des anti-oxydants pendant l'irradiation. De plus il serait intéressant de réaliser les irradiations sur des cellules qui sur-expriment PARP afin de vérifier si l'on diminue l'accumulation de cassures simple-brin et l'installation du phénotype sénescence.

L'accumulation des foyers XRCC1 est corrélée avec la mise en place d'un phénotype sénescence en bordure proche et pourrait être le point de départ du sarcome radio-induit :

Nous avons observé durant ce travail que les cellules qui sont irradiées quotidiennement avec une dose de 2 Gy plein champ tendent à acquérir un phénotype sénescence. Ceci est vrai pour le plein champ, pour la bordure proche

mais aussi quelque peu pour la bordure lointaine. En effet nous observons une augmentation de l'intensité C12FDG, de la taille et de la granularité des cellules dans l'ensemble des zones avec un effet d'autant plus marqué dans le PTV, qu'en bordure proximale, qu'en bordure distale. De plus nous avons montré sur les mêmes cellules que les foyers XRCC1 s'accumulent en bordure proximale et que l'intensité de ces foyers augmentent pendant le traitement. A l'inverse nous n'observons pas d'augmentation des foyers 53BP1 en bordure proximale. En parallèle nous avons montré que la capacité de prolifération se voit totalement altérée en plein champ, mais également en partie en bordure proche, et très légèrement en bordure lointaine. Enfin une étude plein champ de l'effet sur le cycle cellulaire confirme cet arrêt dans le cycle principalement en phase G1.

Dans les kératinocytes, la persistance des foyers entraîne l'activation de p38MAPK qui entraîne une augmentation de la transcription de p16 et un arrêt du cycle cellulaire. Les 1er Wester Blot montrent une augmentation p16, mais seulement transitoirement pendant les 1ères irradiations. Donc les mécanismes d'arrêt dans le cycle restent à élucider.

D'autres part, la sénescence est considéré comme un état d'arrêt dans le cycle cellulaire irréversible, donc comme un suppresseur de tumeur. Ceci parce que la sénescence est associée à une activation de la voie DDR permanente au niveau des télomères raccourcis qui sont des dommages irréparables (FUMAGALLI et al. 2014; FAGAGNA 2008).

Dans les fibroblastes irradiés qui sont devenus sénescents en bordure du champ d'irradiation, la voie DDR ne semble pas être activée puisque l'on n'observe pas de foyers 53BP1. Par contre on observe une activation SSBR anormale (foyers XRCC1 permanents et qui augmentent de taille). Ainsi l'hypothèse ici est que la sénescence pourrait être réversible et associée à des cassures non réparées. Cela pourrait donner la possibilité d'émergence de cellules mutées. D'ailleurs ce mécanisme a été montré dans mon équipe dans le cas de la sénescence normale des kératinocytes (NASSOUR et al. 2016). Ainsi l'étape qui va suivre devra montrer si oui ou non les cellules peuvent sortir de cette sénescence radio-induite et si oui, des tests de transformations cellulaires devront être réalisés.

Influence des nouvelles technique (IMRT et stéréotaxie) sur le risque de développer un second cancer après irradiation :

Les nouvelles techniques de radiothérapie comme la technique de radiothérapie avec modulation d'intensité (IMRT), permettent de concentrer la dose dans la tumeur tout en épargnant au maximum les tissus sains. Ces techniques permettent donc d'augmenter la dose délivrée dans la tumeur et par conséquent de maximiser les chances de guérison du patient. Pour cela il est question d'utiliser de nombreux faisceaux d'irradiation et de nombreux points d'entrée dans les tissus sains afin d'augmenter la dose dans le PTV. Même si les résultats en terme de stérilisation de la tumeur et de protection des organes sains sont indéniables, il faut prendre en considération de possibles conséquences en terme d'augmentation de la probabilité de développer un second cancer en territoire irradié. En effet dans cette technique de nombreuses cellules saines reçoivent une faible dose et donc pourraient accumuler des cassures simple-brin et entrer en sénescence comme nous l'avons montré. Cette état de sénescence pourrait être réversible et donné naissance à des cellules mutées et donc être à l'origine d'un second cancers. Plus précisément, Selon Hall et Wu, le risque de second cancer devrait augmenter avec le passage de la radiothérapie tridimensionnelle à modulation d'intensité (RCMI) du fait d'une majoration du volume cellulaire recevant de faibles doses.(HALL et WUU 2003) De plus des études montrent que le risque de sarcome en territoire irradié semble dépendre de la dose. En effet plus la dose au PTV augmente et plus le risque de développer un sarcome en territoire irradié augmente.(BOICE et al. 1988 ;TUCKER et al. 1987). Une autre étude estime que la RCMI augmente la dose d'un facteur 5 dans certaines zones hors du PTV. Ainsi un risque de cancer induit de 1.7 % pour la radiothérapie classique passe à 2.1 % pour la RCMI avec un rayonnement de 10 MV et de 5.1 % avec un rayonnement de 18 MV (KRY et al. 2005). Dans une autre étude qui compare des modèles de relation dose-réponse, les risques carcinogènes de la RCMI et de la radiothérapie conformationnelle tridimensionnelle se sont avérés comparables, pour toute les localisations et quel que soit le modèle utilisé (RUBEN et al. 2008).

Les techniques de radiothérapie stéréotaxique permettent d'irradier le PTV avec une dose plus importante. Or des études montrent que le risque de sarcome

en territoire irradié semble dépendre de la dose et plus la dose au PTV augmente et plus le risque de développer un sarcome en territoire irradié augmente (BOICE et al. 1988 ;TUCKER et al. 1987).

En conclusion, l'augmentation du risque de sarcome en territoire irradié lié à la aux nouvelles techniques reste controversée. Cela l'est d'autant plus que ces différentes études utilisent des modèles qui ne rendent pas bien compte des effets à faible dose. Les techniques étant très récentes nous n'avons pas encore de données cliniques pour évaluer l'effet réel de ces techniques sur la prévalence des sarcomes et plus généralement des cancers en territoire irradié. Cependant il est certain que les avantages des nouvelles techniques, notamment sur la qualité de la balistique ne doivent pas être remis en cause.

La science a fait de nous des dieux
avant même que nous méritions
d'être des hommes.

Jean Rostand

Chapitre 8

Modélisation du devenir cellulaire après traitement cytotoxique : Introduction

Grâce aux méthodes de pointe utilisées dans les sciences du vivant, ces dernières décennies ont vu s'accumuler un nombre d'informations considérable. Ainsi de plus en plus de données nécessitent une analyse mathématique approfondie. En outre les résultats théoriques de la biophysique moderne sont en mesure d'apporter une aide à la compréhension des phénomènes biologiques complexes. Cependant faire le lien entre ces deux disciplines qui sont la biologie expérimentale et la biophysique théorique est encore complexe. Par exemple dans le cas de la modélisation des phénomènes biologiques consécutifs à un traitement par radiothérapie, les modèles mathématiques et biophysiques existant ne prennent pas suffisamment en compte les phénomènes biologiques connus à l'échelle moléculaire. Le travail effectué dans le cadre de cette thèse avait pour objectif principal de tenter d'apporter une réponse à ce manque. En effet à travers ce travail interdisciplinaire de biologie expérimentale et de modélisation l'objectif était d'introduire dans un modèle du devenir cellulaire des phénomènes complexes tels que le cycle cellulaire, la sénescence, l'endommagement et la réparation de différents types de dommages à l'ADN, ainsi que les phénomènes de diffusion de composés dans le milieu extracellulaire et intracellulaire.

L'objectif ultime de ce modèle aurait été, idéalement, de pouvoir l'utiliser pour analyser et interpréter les résultats présentés dans la partie I de la thèse. Cependant, les limites de temps n'ont pas permis de compléter cet objectif. Donc, après avoir validé notre modèle et son logiciel associé sur une étude des courbes de survie cellulaire (voir Sections 9.3 et 9.4), et de l'effet "bystander" (Section 9.5) (dans les deux cas, en utilisant des données déjà publiées par d'autres groupes), nous avons eu seulement l'occasion de l'utiliser dans une de nos expériences de saturation de la réparation des cassures de l'ADN (voir Section 10).

8.1 Les modèles mathématiques utilisés en radiobiologie

Dans cette partie il sera question de présenter les modèles mathématiques existant en radiobiologie qui permettent de décrire la réponse d'une population cellulaire à une irradiation. Ces différents modèles ont pour objectif principal la modélisation de la survie cellulaire après irradiation. Ces modèles après calibration avec des données expérimentales peuvent être un outil intéressant pour estimer l'effet d'un traitement en radiothérapie. Bien que présentant un certain nombre de limites, les modèles mathématiques peuvent fournir de très bonnes informations sur le comportement d'une population cellulaire et peuvent avec les données expérimentales aider à la décision lors de la mise en place d'un protocole de radiothérapie.

Les modèles balistiques sont les plus utilisés par les cliniciens pour estimer l'efficacité du traitement ainsi que les potentiels effets sur les tissus sains. Ces modèles sont inspirés de la théorie des cibles introduite autour des années 1920. Dans la théorie des cibles, la cellule contient des structures vitales dénommée "cibles" qui lorsqu'elles sont touchées par les particules ionisantes conduisent à la mort cellulaire. Il existe différents modèles utilisant cette théorie des cibles en passant du simple "modèle une cible à un coup", pour aller vers un modèle plus élaboré tel que le "modèle linéaire quadratique". Nous avons vu par avant que l'ADN est la cible principale des rayonnements ionisants en terme d'effet sur la vie cellulaire, ainsi les chromosomes peuvent être considérés comme les

structures vitales principales dans les modèles balistiques.(BRENNER et al. 1998)

Cependant, il faut souligner que les modèles balistiques sont basés sur une approche empirique du problème de l'endommagement cellulaire, et ils ne spécifient pas les correspondances microscopiques des "lésions". Notamment, pour le modèle linéaire-quadratique (voir plus avant, Section 8.1.4) l'existence d'un terme quadratique avec la dose n'est pas justifiable de manière fondamentale, mais il trouve sa raison d'être surtout dans l'utilité pratique au quotidien(DALE 1985). Ces modèles sont donc à considérer surtout comme des fonctionnels empiriques, qui donnent un fit plus ou moins bon des résultats expérimentaux.

8.1.1 Modèle Une cible à Un coup

Dans ce modèle très simple il s'agit de considérer que la cellule ne possède qu'une seule cible, et qu'il suffit qu'elle soit touchée une seule fois (un coup) pour être inactivée (le terme "inactivée" renvoie ici à un processus irréversible) et donc conduire à la mort de la cellule. Selon la loi de Poisson, la probabilité de toucher une cible est une fonction exponentielle de la dose. Ainsi nous avons la probabilité de survie cellulaire qui s'écrit :

$$S = e^{-\frac{D}{D_0}} \quad (8.1)$$

Dans ces conditions, la courbe de survie est une droite et chaque incrément de dose entraîne la même proportion de cellule tuées. D est la dose déposée et D_0 est la dose moyenne létale et correspond à un taux de survie égal à $\frac{1}{e}$, soit à un taux de survie égal à 0.37.

8.1.2 Modèle N cibles à un coup

A l'inverse du modèle à une cible, ici il s'agit de considérer que la cellule possède un nombre n de cibles. Chacune d'elles peut être inactivée par les rayonnements ionisants. Si toutes les cibles sont inactivées alors cela conduit à la mort de la cellule. On dit alors que la cellule est le siège de lésions sub-létales dont l'accumulation conduit à la mort cellulaire. En d'autres termes, les lésions sont sub-létales individuellement mais létales collectivement. Toujours avec la

loi de poisson la probabilité d' inactiver une cible s'écrit :

$$P_1 = 1 - e^{-\frac{D}{D_0}} \quad (8.2)$$

Ainsi pour inactiver les n cibles on obtient l'équation :

$$P_n = [1 - e^{-\frac{D}{D_0}}]^n \quad (8.3)$$

Nous avons donc la probabilité de survie cellulaire qui s'écrit :

$$S = 1 - [1 - e^{-\frac{D}{D_0}}]^n \quad (8.4)$$

8.1.3 Modèle à deux composantes

Ce modèle est une association des deux modèles précédents, en effet il est question de considérer que la cellule est constituée d'une cible létale d'emblée qui provoquera la mort de la cellule si elle est touchée, et d'un ensemble de cibles sublétales qui lorsqu'elles seront toutes inactivées entraineront la mort de la cellule. Par réunion des deux équations de survie précédentes nous obtenons l'expression de la survie cellulaire suivante :

$$S = e^{-\frac{D}{D_{01}}} [1 - (1 - e^{-\frac{D}{D_{02}}})^n] \quad (8.5)$$

Dans cette expression D_{01} correspond à la dose moyenne létale pour la composante une cible létale d'emblée et D_{02} correspond à la dose moyenne létale d'emblée pour la composante n cibles sublétales.

8.1.4 Modèle linéaire quadratique

Le modèle linéaire quadratique BRENNER et al. 1998 est le modèle le plus utilisé actuellement pour décrire les courbes de survie cellulaire. Il fait intervenir deux composantes : la première est celle du modèle linéaire, et la deuxième est celle d'un modèle quadratique. L'expression de la survie cellulaire est donc :

$$S = e^{-(\alpha D + \beta D^2)} \quad (8.6)$$

Dans cette équation S est la survie, D la dose de rayonnement, et α et β des paramètres ajustables qui déterminent la radiosensibilité. Le paramètre α représente la tangente à l'origine de la courbe. Le paramètre β détermine la mortalité liée au carré de la dose, c'est le facteur quadratique. Celui-ci est corrélé avec la manifestation des lésions sub-létales. Bien qu'elle ne prenne pas en compte la complexité des phénomènes biologiques l'équation linéaire quadratique est un outil de travail utilisé par les radiothérapeutes depuis 35 ans. Elle est validée dans l'usage quotidien pour des doses supérieures à 1 Gy, et permet d'adapter le fractionnement à la situation clinique et a souvent été utilisée pour suggérer et tester de nouvelles modalités de fractionnement du traitement. Le protocole de radiothérapie le plus classique en radiothérapie conformationnelle 3D consiste à délivrer une dose de 2 Gy par jour, et ceci 5 jours par semaine, jusqu'à atteindre la dose maximale tolérée par les tissus sains. La corrélation entre la valeur de survie à 2 Gy et la réponse en radiothérapie est donc directe.

Le rapport $\frac{\alpha}{\beta}$, exprimée en Gy, correspond à la dose pour laquelle le terme linéaire et le terme quadratique contribuent pour une part égale à la létalité globale. Pour le radiothérapeute, ce rapport caractérise de façon satisfaisante l'épaule de la courbe. Dans les tissus où α est grand devant β , l'effet des faibles doses prime et le fractionnement n'influence que peu la survie et inversement. Ce qui compte ici est que dans les tissus sains donnant lieu à des complications tardives, le rapport $\frac{\alpha}{\beta}$ est plus petit (de 1 à 5) que pour les tissus à complications précoces et la plupart des tumeurs (de 6 à 20). C'est pourquoi une faible dose par séance protège les tissus à faible rapport $\frac{\alpha}{\beta}$ et réduit le risque de complication tardive.

8.1.5 Modèle Markovien de la réponse cellulaire

Dans le modèle Markovien, on suppose que la cellule possède m cibles radiosensibles et réparables. Ces m cibles peuvent être désactivées (le terme "désactivée" renvoie ici à un processus réversible) par les radiations ionisantes, et la mort de la cellule est la conséquence de la désactivation de l'ensemble des m cibles. Les différences principales avec les autres modèles sont :

- La possibilité d'étudier le comportement d'un échantillon de cellules

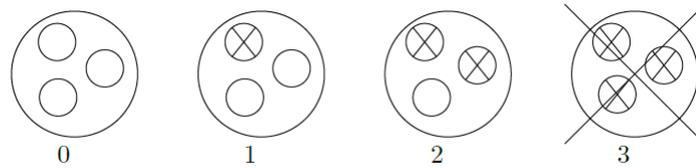


FIGURE 8.1 – modèle markovien pour $m = 3$ cibles. Les cercles vides indiquent une cible intact, les cibles avec un X indiquent une cible désactivée. Si toute les m cibles sont atteintes, la cellule est "morte" (KEINJ 2011)

ayant chacune un état d'endommagement qui lui est propre. Ceci est donc intéressant du point de vue de la biologie, puisque chaque cellule peut répondre différemment à l'irradiation.

- la possibilité d'engager des processus de réparation cellulaire, c'est à dire de réactiver les cibles désactivées.

Après un traitement par radiothérapie chaque cellule se trouve dans un des $m + 1$ états d'endommagement. Une cellule "vivante" après traitement se trouve dans l'état i si un nombre i des m cibles ont été désactivées durant le traitement. Dans ces conditions $i \in \{0, 1, 2, \dots, m - 1\}$. Dans le cas ou $i = m$ alors la cellule est "morte". (KEINJ 2011)

Nous allons ci-après décrire l'effet du traitement en introduisant les probabilités de transitions. On introduit donc la probabilité $P(i, j)$ qui correspond au passage de l'état i vers l'état j . On considère qu'une cible est désactivée avec une probabilité q ceci indépendamment des autres cibles. Nous allons introduire les probabilités à l'aide d'une loi binomiale.

Une cellule passe de l'état 0 dommage à l'état j dommages par la désactivation de j cibles actives avec la probabilité suivante :

$$P(0, j) = \binom{m}{j} q^j (1 - q)^{m-j} \quad (8.7)$$

Une cellule passe de l'état 1 dommage à l'état j dommages par la désactivation de

$j - 1$ cibles actives parmi les $m - 1$ cibles encore actives en suivant la probabilité :

$$P(1, j) = \binom{m-1}{j-1} q^{j-1} (1-q)^{m-j} \quad (8.8)$$

Donc une cellule passe de l'état i dommages à l'état j dommages par la désactivation de $j - i$ cibles parmi les $m - i$ cibles encore actives en suivant la probabilité :

$$P(i, j) = \binom{m-i}{j-i} q^{j-i} (1-q)^{m-j} \quad (8.9)$$

Enfin si la cellule est dans l'état $(m - 1)$ dommages elle peut rester dans cet état avec une probabilité $P(m - 1, m - 1) = 1 - q$, ou passer à l'état m dommages qui correspond à la mort de la cellule avec une probabilité $P(m - 1, m) = q$. Si la cellule est morte alors elle reste dans cet état avec la probabilité $P(m, m) = 1$.

Ainsi nous pouvons écrire l'expression générale de la matrice P qui modélise l'effet de la radiothérapie par :

$$P = \begin{pmatrix} 1 - q^m & \binom{m}{1} q (1-q)^{m-1} & \dots & q^m \\ 0 & (1-q)^{m-1} & \dots & q^{m-1} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ 0 & 0 & \dots & q \\ 0 & 0 & \dots & 1 \end{pmatrix} \quad (8.10)$$

Avec ce modèle il est également possible de modéliser la réparation des cellules après le traitement en considérant qu'une cellule qui n'est pas morte peut enclencher des mécanismes de réparation des cibles. Cela se traduit par la réactivation de cibles désactivées. Nous pouvons comme précédemment utiliser une loi de probabilité binomiale pour construire la matrice de transition.

Une cellule qui est dans l'état 0 dommage reste dans cet état avec une probabilité 1 car aucune cible n'a été touchée pendant le traitement. Une cellule qui est dans l'état 1 dommage a une cible touchée et peut donc la réparer pour retourner à

l'état 0 avec une probabilité r . Ainsi une cellule qui est dans l'état $i \leq m - 1$ peut retourner dans l'état j si $i - j$ cibles sont réparées avec une probabilité :

$$R(i, j) = \binom{i}{i-j} r^{i-j} (1-r)^j \quad (8.11)$$

Cela donne la matrice R qui modélise la réparation après traitement :

$$R = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & \dots & 0 \\ r & (1-r) & 0 & \dots & 0 \\ r^2 & \binom{2}{1} r(1-r) & (1-r)^2 & \dots & 0 \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 0 & 0 & 0 & \dots & 1 \end{pmatrix} \quad (8.12)$$

Chaque cellule est représentée par un vecteur d'état $\mathbf{v} = (v_0, \dots, v_m)$ dont les composantes expriment la probabilité que dans la cellule un nombre k de cibles soit active/désactive. L'application réitérée du produit matriciel $\mathbf{P} \times \mathbf{R}$ permet de faire évoluer l'ensemble des cellules selon la chaîne de Markov.

8.2 Développement d'un modèle du devenir cellulaire après traitement cytotoxique incluant différents types de dommages à l'ADN et différents devenir cellulaires

Nous comprenons à travers cette introduction sur les modèles mathématiques utilisés en radiobiologie qu'il ne prennent pas pour l'heure suffisamment en compte la complexité des phénomènes biologiques mis en jeu pendant et après l'irradiation.

Ainsi durant ma thèse, le travail principal a consisté en le développement d'un modèle mathématique, et son logiciel numérique de simulation décrivant l'évolution d'un ensemble de cellules discrétisées. Ce modèle, fondé sur les développements de la théorie physique de la probabilité et des systèmes dynamiques,

a pour vocation l'étude théorique de l'évolution d'une population de cellules soumises à des contraintes différentes, parmi lesquelles l'action immédiate et retardée des traitements radio thérapeutiques. L'objectif principal était de développer un modèle contenant les caractéristiques principales permettant de décrire au mieux l'évolution d'une population cellulaire soumise à un agent cytotoxique. Notre modèle consiste donc en un modèle théorique multi-agents ("agent-based model"), où chaque "agent" contient les informations principales de la vie cellulaire. Ainsi les caractéristiques majeures tel que cycle cellulaire, prolifération, sénescence, endommagement de l'ADN, réparation et mutation de celui-ci, transformation des cellules et diffusion ont été incluses dans notre modèle. Nous allons dans la partie qui suit décrire en détail ce modèle, ainsi que les résultats obtenus dans le cadre de l'application de celui-ci à la reconstruction des courbes de survie obtenues après irradiation et à l'effet "bystander" en radiothérapie. Dernièrement, une simple application du modèle à des données expérimentales obtenues dans notre laboratoire sur des cellules irradiées, sera aussi présentée.

Ce travail a fait l'objet d'une publication "A biophysical model of cell evolution after cytotoxic treatments : Damage, repair and cell response" (Journal of Theoretical Biology) présentée en annexe.(TOMEZAK et al. 2016)

Modélisation du devenir cellulaire après traitement cytotoxique : le modèle

9.1 Description du modèle et de ses paramètres

Nous avons construit un modèle théorique multi-agents ("agent-based model") pour décrire l'évolution d'une population cellulaire dans des conditions normales, mais aussi en réponse à une perturbation physique ou chimique. Chaque cellule est représentée par un "agent", et des lois de probabilité viennent définir le comportement de l'agent comme unité indépendante, mais également comme unité en interaction avec chacun des autres agents. Dans le modèle présenté ici chaque agent est positionné sur une grille en deux dimensions, il peut dès lors se déplacer sur les cases de cette grille tout en portant les informations sur son état. Une cellule u placée sur le site i est labellisée par $u(i)$. Le comportement et l'état dans le temps de chaque agent sont caractérisés par un certain nombre de descripteurs qui sont regroupés dans le vecteur état $n(t)$. Nous verrons l'ensemble de ces descripteurs dans la suite de l'exposé.

9.1.1 Formalisation du cycle cellulaire normal

Nous savons que la division cellulaire se fait de manière ordonnée en suivant le cycle cellulaire. Dans notre modèle chaque cellule possède une horloge locale qui est fonction du temps écoulé depuis le début de la simulation à savoir t et du moment de la dernière duplication t_0 . Nous avons donc le temps local (interne) de la cellule qui s'exprime comme :

$$t_d = t - t_0 \quad (9.1)$$

Chaque cellule pourra mettre un certain temps pour se diviser. Ce temps peut être paramétré à tout instant selon la rapidité de division du type cellulaire choisi pour la modélisation. Nous pouvons également paramétrer le temps de chaque phase du cycle cellulaire. Par exemple nous pouvons choisir un temps de division de 24h dans la phase de croissance exponentielle, avec une phase G1 allant de $td = 0$ à 750 min, une phase S allant de $td = 751$ à 1250 min, une phase G2 allant de $td = 1251$ à 1370 min et une phase M allant de $td = 1371$ à 1440 min. Les cellules peuvent être synchronisées au départ c'est-à-dire commencer toute avec le même t_0 , mais typiquement la configuration de départ est obtenue en distribuant de manière aléatoire les cellules dans les quatre phases. Afin d'introduire de la variabilité dans le temps de division nous introduisons la probabilité de duplication suivante :

$$P_{dupl} = \frac{\phi}{4} \left(\frac{1}{1 + e^{-(t_d - 1370)/\tau}} \right) \quad (9.2)$$

avec la constante de temps de duplication $\tau \simeq 30$ min, and $\phi = 1, 2, 3, 4$ pour G1, S, G2, M, respectivement. Il est possible pour les cellules de rentrer dans la phase G0 et donc d'arrêter leur duplication, avec $\phi = 0$.

9.1.2 Formalisation du phénomène de sénescence normale

Les cellules normales peuvent après un nombre fini de duplications rentrer dans un état de sénescence (HAYFLICK 1965; CRISTOFALO et al. 2004). En plus d'autres changements phénotypiques, la sénescence modifie ou supprime la capa-

cité pour les cellules à proliférer, mais ceci en gardant une activité métabolique viable. La sénescence peut survenir aussi prématurément dans les cellules jeunes soumises à des agents géno-toxiques (ZDANOV et al. 2007). Nous introduisons cette caractéristique dans notre modèle en multipliant la fonction de duplication introduite précédemment par le facteur S définie par :

$$S = 1 - \frac{D - D_0}{D_s - D_0} \quad (9.3)$$

pour $D_0 < D \leq D_s$. D représente le nombre de duplications déjà effectuées par chaque cellule, D_0 représente le nombre de duplications à partir duquel une cellule peut entrer dans un état de sénescence et enfin D_s représente le nombre maximum de duplications au delà duquel la cellule est obligatoirement dans son état de sénescence. Les valeurs des constantes D_0 et D_s peuvent être ajustées pour reproduire la survenue de la sénescence dans n'importe quel type cellulaire.

9.1.3 Formalisation de l'endommagement de l'ADN suite à l'exposition à l'agent cytotoxique

Une des originalités du modèle est que nous avons introduit la possibilité pour les cellules d'accumuler différents types de dommages. Ainsi pour modéliser l'endommagement cellulaire consécutif à l'exposition à l'agent toxique, nous nous sommes concentrés à améliorer le modèle Markovien de la réponse cellulaire. Rappelons que dans ce modèle, il est supposé que chaque cellule contient m cibles vitales. L'agent toxique est en capacité de désactiver les cibles. Si toutes les cibles sont désactivées alors la mort de la cellule survient. Le tout est géré par un processus multi-états markovien. Dans notre modèle il est toujours question d'utiliser la notion de cibles mais avec en plus l'idée d'introduire le fait que les dommages peuvent être de type différent. Ainsi dans le modèle que nous proposons les cellules sont constituées de deux types de cibles, à savoir les cibles "cassures double-brin" et les cibles "cassures simple-brin". Nous appelons z_ν le nombre de dommages de types ν , avec $\nu = 1$ pour les CDB et $\nu = 2$ pour les CSB. Notons ici que dans une version supérieure la possibilité d'ajouter d'autres types de dommages se fera aisément. Pour construire la matrice de transition

du processus de markov associé à chaque type de dommage on introduit la probabilité p_ν . Il faut aussi introduire la probabilité r_ν afin d'introduire la notion de réparation des dommages par les cellules.

Nous définissons la probabilité $P_n(t)$ qu'une cellule se trouve dans l'état n au temps t , avec $P_n \geq 0$ et $\sum_n P_n = 1$. l'équation à temps continu de la chaîne de Markov est :

$$\frac{dP_n(t)}{dt} = \sum_l W_{nl} P_l(t) + S_n \quad (9.4)$$

exprimant le fait que la probabilité d'observer l'état n de la cellule au temps t est donné par la somme de toute les probabilités de venir de n'importe quel $l \neq n$ état, multiplié par la matrice de transition W_{nl} . S_n est un terme "source", représentant la probabilité que la cellule est arrivée dans l'état n de la division cellulaire à un temps t . La matrice de transition qui caractérise l'évolution de l'état de la cellule est :

$$W_{nl} = \sum_\nu (\dot{\Delta} L_{nl}^\nu + R_{nl}^\nu) \quad (9.5)$$

où L_{nl}^ν représente la probabilité de faire $l-n=d$ dommages de type ν , induite par une dose/unité de temps Δ (le point indique la dérivée par rapport au temps), et R_{nl}^ν la probabilité de réparer d dommages de type ν .

Quand on considère que le nombre d'événements par unité de temps dans chaque noyau cellulaire est relativement faible, les éléments de matrice de D peuvent être attribués sous la forme d'une distribution de Poisson. En supposant un spectre d'énergie du rayonnement $f(\epsilon)$, et en suivant le raisonnement de Sachs (R. K. SACHS et al. 1990 ; R. SACHS, HLATKY et HAHNFELDT 2001), pour chaque type de dommages ν la probabilité de passer de l'état n dommages à un état $n+d$ dommages est donné par la matrice :

$$L_{n,n+d}^\nu = \begin{pmatrix} \mu_0 & 0 & 0 & \dots & 0 \\ \mu_1 & \mu_0 & 0 & \dots & 0 \\ \mu_2 & \mu_1 & \mu_0 & \dots & 0 \\ \dots & \dots & \dots & \dots & 0 \\ \mu_d & \mu_{d-1} & \mu_{d-2} & \dots & \mu_0 \end{pmatrix} \quad (9.6)$$

avec :

$$\mu_k = \int_0^\infty \frac{e^{-\epsilon} \epsilon^k}{k!} f(\epsilon) d\epsilon \quad (9.7)$$

Le spectre d'énergie est discret, et pour chaque intervalle la distribution de Poisson est remplacée par la limite d'une distribution binomiale :

$$L_{n,n+d}^v = \lim_{m_0 \rightarrow \infty} \binom{m_0 - n}{d} p_v^d (1 - p_v)^{m_0 - n - d} \quad (9.8)$$

Le choix de la matrice de réparation R dépend des détails des processus enzymatiques conduisant à réparer les CDB, CSB, etc. Dans ce travail, nous adoptons une approche simpliste en choisissant un modèle linéaire simple, dans lequel la réparation dépend du nombre de lésions, avec une matrice R , dont la valeur numérique est différente pour chaque type de lésion :

$$R_{n,n-d}^v = -r_v d \quad (9.9)$$

ce qui se traduira par une distribution de probabilité de la réparation exponentielle.

9.1.4 Formalisation de l'arrêt du cycle cellulaire, de la mortalité cellulaire et de la reprise de prolifération

Que ce soit le résultat de la sénescence normale ou induite, ou que ce soit le résultat des dommages induits par les rayonnements ionisants, les cellules peuvent arrêter leur cycle de duplication dans l'une des quatre phases du cycle. Nous construisons donc pour cette événement la probabilité suivante :

$$P_{arr} = \begin{cases} 1 & \text{if } z_1 > 0 \\ 1 - S & \text{if } z_1 = 0 \end{cases} \quad (9.10)$$

ou z_1 représente le nombre de CDB de l'ADN et S le facteur de sénescence introduit précédemment.

Une fois dans cet état "d'arrêt cellulaire", une cellule peut prendre à chaque pas de temps l'une des trois alternatives proposées dans la figure 9.0. Tout d'abord, elle peut mourir et être éliminée de la population. Pour cet événement, nous introduisons une probabilité qui est la même quel que soit le type de mort :

$$P_{mort} = \min \left[1, \left(\frac{z_1}{N_{crit}} \right)^\alpha \right] \quad (9.11)$$

avec $\alpha > 1$ un paramètre de ralentissement, et N_{crit} un seuil critique de CDBs accumulées conduisant à la mort cellulaire (paramètre de "mortalité"). La valeur du seuil dépend du type de cellule et des conditions d'irradiation, avec des valeurs typiques allant de $N_{crit} \sim 5$ à $N_{crit} \sim 50$.

Une autre alternative est que la cellule redémarre dans son cycle de duplication. Nous introduisons pour cet événement la probabilité :

$$P_{reprise} = e^{-\beta z_1} \quad (9.12)$$

avec $1/\beta \sim 0,5$ à 2 , qui exprime l'efficacité de l'action de réparation, et avec $P = 1$ lorsque z_1 retourne à 0 .

Enfin, la cellule peut rester à l'état d'arrêt avec la probabilité $(1 - P_{mort} - P_{reprise})$ jusqu'au pas suivant de simulation ou toutes les probabilités seront à nouveau testées.

9.1.5 Formalisation de la diffusion

Dans notre modèle nous avons inclus la possibilité d'étudier des phénomènes de diffusion. En effet ces phénomènes jouent un rôle prépondérant dans le cadre des traitements par agent cytotoxique. Par exemple dans le cadre d'un traitement par radiation, nous retrouvons les phénomènes de diffusion des radicaux libres et des espèces réactives de l'oxygène. Nous retrouvons également la diffusion d'espèce chimique dans l'effet "bystander" en radiothérapie qui décrit que l'irradiation d'une cible à des effets sur des cibles au voisinage ou même distante. Ainsi pour introduire la diffusion, chaque espèce chimique μ avec la concentration variable c^μ , à la possibilité de diffuser sur les sites de la grille à chaque pas de simulation Δt , affectant de cette manière les cellules par divers

processus biologiques. Dans chaque cellule $u(i)$, située sur le site du réseau i , la diffusion des produits chimiques sont comptabilisés selon une loi de Fick :

$$c_{u(i)}^\mu = - \sum_{j'} (c_{u(j')}^\mu - c_{u(i)}^\mu) \frac{\Delta t}{\theta^\mu} + s_{u(j)}^\mu \quad (9.13)$$

Où la somme ne fonctionne que sur les sites j' qui sont les plus proches voisins du site i , et ceci est fonction de la topologie du réseau choisi. Dans cette première mise en œuvre il s'agit d'un diamant de topologie 2D, le côté droit de l'équation précédente est donc juste une représentation discrète du Laplacien, multiplié par le pas de simulation, divisé par l'échelle de temps de la diffusion θ^μ qui joue le rôle (avec des dimensions appropriées) d'un coefficient de diffusion nominal. s^μ représente un terme source, laquelle peut être située sur un site spécifique du réseau, ou un ensemble de sites. Le facteur chimique provenant de la source diffuse à travers la grille vide jusqu'à atteindre les cellules. Aussi, cette source de facteur chimique peut être contenue dans une cellule, provoquant ainsi une diffusion sur le réseau. Cette source peut se déplacer en même temps que le déplacement de la cellule. Notons que la membrane cellulaire représente une barrière semi-perméable pour la quasi-totalité des molécules et des ions, avec des coefficients de perméabilité beaucoup plus petits que la diffusion dans la phase liquide environnante. Sauf cas particuliers, par conséquent, la diffusion sur les sites vides est considérée comme instantanée, tandis que le franchissement de la membrane par les espèces μ est caractérisé par un temps de diffusion θ^μ qui est fonction de l'état des cellules et de la densité locale. Enfin il faut noter que la concentration locale d'une espèce est contenue dans la cellule $u(i)$ occupant le site i , et non sur le site lui-même. Les concentrations d'espèces peuvent ainsi provenir soit de sources diffuses sur la grille soit des cellules directement. Par exemple, la concentration en oxygène à la cellule $u(i)$ est le résultat du champ de concentration existant sur le site i , plus la pente éventuelle provenant des cellules voisines $u(j')$.

9.1.6 Simulation Monte Carlo

L'espace de simulation est défini par une grille carrée 2D contenant $N \times N$ sites, labellisés par un entier positif $i \leq N^2$. Dans ce présent travail nous adoptons une relation minimale entre voisins (aussi appelée "Von Neumann"). Ainsi chaque site "i" interagit avec ses quatre proches voisins (vide ou occupé) localisés immédiatement au dessus, en dessous, à gauche et à droite du site "i". Au début de la simulation un ensemble de cellules N_c , généralement très inférieur à l'ensemble des sites du réseau, est dispersé sur le réseau, soit au hasard, soit en une ou plusieurs colonies compactes. Les cellules peuvent se déplacer sur le réseau par des sauts discrets à des sites voisins. Il est déjà connu d'après des études antérieures que la topologie du réseau sous-jacent peut induire des caractéristiques irréalistes de la morphologie tissulaire. Toutefois, dans le présent travail les déplacements cellulaires sont soit pas considérés du tout, soit autorisées pour atteindre la confluence. D'autre part, si l'on est intéressé par la simulation de tissus et la morphogénèse des tumeurs, une topologie de réseau plus dense ou une mosaïque de Voronoi pourrait être adoptées, et finalement une extension 3D du modèle deviendrait nécessaire. Chaque cellule est dans un état qui lui est propre et celui-ci est décrit par un ensemble d'indicateurs à travers le "vecteur état" de la cellule : $\mathbf{n} = \{i, t_d, \phi, T, \lambda, z_v, p_v, r_v, c^\mu, \theta^\mu\}$. Avec i qui donne la position de la cellule sur la grille, t_d le temps local de la cellule, ϕ la position dans le cycle cellulaire, T le type cellulaire, λ l'état de la cellule, z_v, p_v, r_v respectivement le nombre de dommages, la probabilité d'endommagement et la probabilité de réparation (avec $\nu = 1$ pour les CDB et $\nu = 2$ pour les CSB), et enfin c^μ et θ^μ donne respectivement la concentration et le coefficient de diffusion de l'espèce chimique μ (voir tableaux 9.1 et 9.2).

Les simulations réalisées dans la suite du travail se décomposent en deux phases. La première phase correspond à la phase d'irradiation et donc à la génération de dommages CSB et CDB selon le processus de Markov décrit précédemment. S'ensuit la phase de réponse cellulaire pendant laquelle la cellule répond aux dommages que ce soit en terme de réparation des cassures ou en terme de vie cellulaire (duplication, arrêt dans le cycle, mortalité). Chaque événement de vie cellulaire est associé à sa propre fonction de probabilité. Résoudre analytique-

ment l'équation de type Kolmogorov pour un ensemble entièrement couplé de probabilités spatiales et temporelles est pratiquement impossible. Nous faisons donc recours à une méthode stochastique de Monte Carlo. A chaque pas de simulation discret Δt du temps total de simulation t , toutes les cellules sont analysées, et leur vecteur d'état \mathbf{n} est mis à jour. Les probabilités pour les divers événements qu'une cellule peut subir sont échantillonnées selon une technique de rejet : Un nombre aléatoire $\xi \in (0, 1)$ est tiré d'une distribution de probabilité uniforme et est comparé à la probabilité de l'événement P . L'événement est accepté si $\xi < P$, sinon il est rejeté. Pour une efficacité numérique, tous ces événements sont décrits dans ce qui suit par des fonctions de probabilité continues, mais il convient de noter qu'à chaque étape de l'échantillonnage Monte Carlo la forme fonctionnelle correspond pratiquement à une réponse binaire "oui/non".

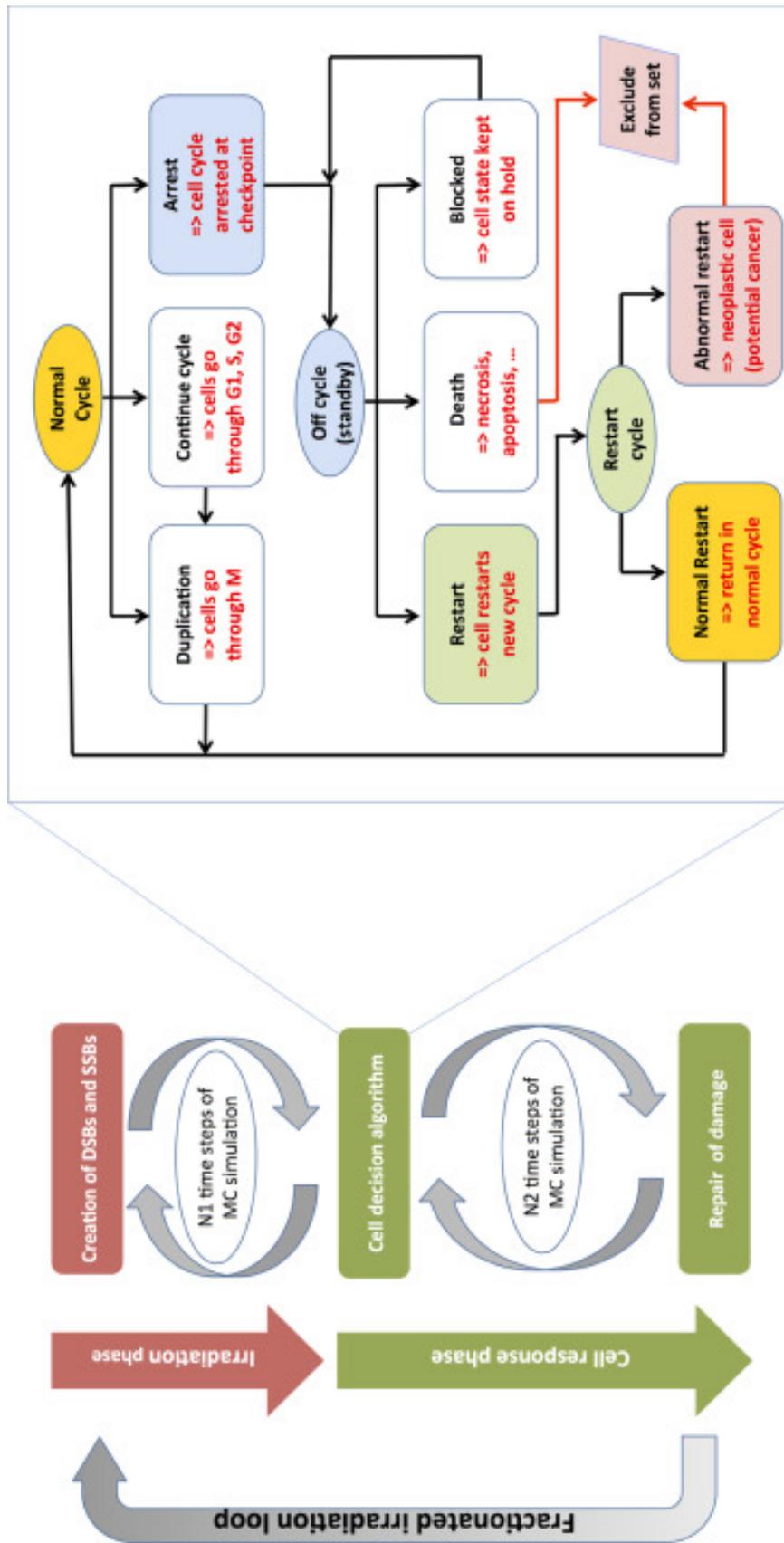


FIGURE 9.0 – Diagramme de Flux de la simulation Monte Carlo (MC) (gauche) et décision de l'algorithme sur le devenir cellulaire (Droite). L'écriture en Noir indique les actions du code informatique ; en rouge la correspondance avec la biologie et le devenir cellulaire ; en blanc des notes explicatives. La phase d'irradiation (rouge) produit des dommages à l'ADN, avec N1 le nombre de pas de simulation. Dans la phase suivante (vert) de réponse cellulaire, les cellules bouclent dans un cycle normal de 24h pour un nombre N2 de pas de simulation MC. Les décisions de l'algorithme sur la droite décrivent comment les cellules vont réagir à l'endommagement. Une cellule s'arrête parce qu'il y a un excès de dommages ou parce qu'elle est devenue sénescence. Soit la cellule peut mourir, rester bloquée dans son cycle ou reprendre son cycle. Dans ce dernier cas la cellule peut reprendre son cycle cellulaire pour revenir à un état normal, ou évoluer vers un état néoplasique. La séquence irradiation-évolution cellulaire peut être répétée (rouge-vert) de manière cyclique, dans le but de simuler un traitement fractionné.

Par exemple si on se focalise sur une cellule $i \in N_c$, au fur et à mesure que le temps t augmente, le temps local t_d de la cellule augmente, et donc sa probabilité de duplication P_{dupl} augmente pour passer d'une valeur proche de 0 dans la phase $G1$, à une valeur proche de 1 dans la phase M . En conséquence à chaque pas de simulation le long du temps t et avec le nouveau $0 < \xi < 1$ tiré aléatoirement nous aurons plus de chance d'obtenir la condition $\xi < P$ au fur et à mesure que P_{dupl} augmente, et ainsi produire l'événement de duplication au moment aléatoire t_0 . Le même sondage aléatoire intervient pour la probabilité de passer de z_ν à $z_\nu + d$ lésions (avec $\nu = 1$ pour les CDB et $\nu = 2$ pour CSB, et une probabilité d'endommagement p_ν si $d > 0$, ou une probabilité de réparation r_ν si $d < 0$); pour la probabilité d'entrer ou sortir de l'état d'arrêt dans le cycle cellulaire; pour la probabilité de mourir; etc.

Dans une simulation typique d'un cycle d'irradiation, les cellules sont irradiées pendant un certain temps de l'ordre de 10 à 100 secondes, avec un pas de temps $\Delta t = 1$ seconde. Ensuite, l'évolution de la population endommagée est suivie pendant un temps de l'ordre de plusieurs heures, avec un typique $\Delta t = 60$ secondes ou plus. Finalement, le cycle irradiation-évolution peut être répété, pour simuler une radiothérapie fractionnée. Par souci de simplicité, nous supposons qu'il n'y a pas d'évolution de la cellule pendant le court temps d'irradiation (mais cette limitation peut être facilement enlevée).

9.2 Calibration du modèle du devenir cellulaire

9.2.1 Calibration de l'induction et de la réparation des CSB et CDB

Après l'étape de construction du modèle il a été question de calibrer les différentes probabilités d'induction et de réparation de l'endommagement cellulaire. Pour ce faire nous avons irradié des cellules NHDFs-F1MC à 2 Gy et nous avons fixé les cellules à différents temps après irradiation pour enfin réaliser des immunofluorescences dirigées contre les protéines XRCC1 et 53BP1 pour quantifier de manière indirecte la quantité de cassure simple et double-brin respectivement. Sur le même graphique nous représentons les données

Symbole	Variable	Unité	Rôle	Valeur
N	taille du réseau		taille linéaire du réseau carré	—
i	index du site		étiquette du site du réseau	$[1, N^2]$
N_c	nombre de cellules		taille de la population de cellules	—
$u(i)$	index de la cellule		label de la cellule u sur le site du réseau	$[1, N_c]$
Δ	dose		quantité d'énergie fournie au cours d'un intervalle de temps donné	$[0, \infty]$
\mathbf{n}	vecteur d'état de la cellule		vecteur contenant tous les paramètres locaux de la cellule	—
t	temps global	secondes	temps universel de la simulation	$[-\infty, \infty]$
Δt	pas de temps	secondes, minutes	incrément de temps discret de la simulation	$[0.001-0.1]$
t_d	temps cellulaire	minutes	horloge locale de chaque cellule	$[0, 1440]$
t_0	temps de duplication	minutes	temps depuis la dernière duplication pour chaque cellule	$[0, \infty]$
τ	constante de temps de la duplication	minutes	voir Eq.(9.2)	30
ϕ	index de la phase cellulaire		defini la phase de chaque cellule (G0,G1,S,G2,M)	$[0, 4]$
T	index du type cellulaire		épithéliale, fibroblaste, nerveuse, muscle, hématopoietique	$[1, 5]$
λ	index de l'état cellulaire		normal, sénescence, quiescent, arrêté, néoplasique, souche, mort	$[1, 7]$
ν	type de dommage		cassure-simple ou double-brin (CSB, CDB)	$[1, 2]$
z_ν	quantité de dommages		nombre de dommages accumulés de type ν	$[0, \infty]$
p_ν	probabilité d'endommagement		probabilité de générer un dommage de type ν	$[0, 1]$
r_ν	probabilité de réparation		probabilité de réparer un dommage de type ν	$[0, 1]$
N_{crit}	Nombre critique		nombre de dommages létaux (CDBs) au delà duquel une cellule est considérée morte	$[5, 100]$
D	nombre de duplication		nombre de duplications effectuées par chaque cellule	$[0, \infty]$
S	facteur de sénescence		décrit la probabilité qu'une cellule soit dans l'état de sénescence	$[1, 0]$
D_0	nombre de duplication		nombre de duplications à partir duquel une cellule peut entrer en sénescence	30
D_s	nombre de duplication		nombre de duplications après lequel une cellule est forcément dans l'état de sénescence	60

TABLEAU 9.1 – Liste des principales variables du modèle. Sauf indication contraire, toutes les variables sont sans dimension.

Symbole	Variable	Unité	Rôle	Valeur
P_n	probabilité de l'état cellulaire		probabilité qu'une cellule soit dans l'état n à un instant donné	[0,1]
P_{dupl}	probabilité de duplication		contrôle la probabilité de duplication de chaque cellule	[0,1]
P_{arr}	probabilité d'arrêt		contrôle la probabilité d'arrêt de la cellule dans son cycle cellulaire suite à l'accumulation de CDBs ou suite à la sénescence	[0,1]
P_{death}	probabilité de mortalité		contrôle la probabilité que la cellule meurt quand le nombre de CDBs de la cellule approche N_{crit}	[0,1]
α	paramètre de ralentissement		ralenti la survenue de la mortalité des cellules quand les CDBs s'accumulent	> 1
$P_{restart}$	probabilité de reprise		contrôle la probabilité qu'une cellule redémarre son cycle cellulaire à partir d'un état arrêté	[0,1]
β	paramètre d'accélération		accélère la capacité de réparation des dommages et permet le redémarrage de la cellule dans son cycle	[0.5-2.]
$c_{u(i)}^\mu$	concentration chimique		concentration instantanée du composé chimique μ dans la cellule $u(i)$	[0,∞]
$s_{u(i)}^\mu$	concentration de la source		source constante d'espèce chimique μ dans la cellule $u(i)$	[0,∞]
θ^μ	temps de diffusion	minutes	coefficient de diffusion inverse pour les espèces μ	[0,∞]
c^B	concentration du facteur B		concentration instantanée du facteur pro-mitogénique de l'effet "bystander"	[0,∞]
s^B	source du facteur B		source constante du facteur pro-mitogénique de l'effet "bystander"	[0,1]
D^B	coefficient de diffusion du facteur B		réciproque de θ^B , temps de diffusion du facteur pro-mitogénique de l'effet "bystander" à travers la membrane cellulaire	[0,1]
γ	paramètre de couplage		couple la concentration du facteur B avec le temps de duplication cellulaire	[0.1-2.]

TABLEAU 9.2 – Liste des principales variables du modèle (suite). Sauf indication contraire, toutes les variables sont sans dimension.

expérimentales ainsi que les données de simulation, c'est l'objet de la figure 9.1. Pour la cinétique d'endommagement nous avons fixé les cellules 20 min, 2h et 24h post-irradiation, parallèlement nous avons des cellules contrôle non irradiées. L'analyse a été réalisée par une technique de haut contenu comme précédemment et au moyen du logiciel Columbus. Pour les cellules contrôle le nombre de foyers XRCC1 est d'environ 10/cellule et pour les foyers 53BP1 il est d'environ 2/cellule. Pour les cellules irradiées nous avons un maximum de CSB d'environ 40/cellule pour 2 Gy et un maximum de CDB d'environ 15/cellule pour 2 Gy. Ainsi en soustrayant le nombre de foyers déjà présents dans les cellules contrôle on peut conclure que l'on génère environ 7 foyers 53BP1/Gy et environ 15 foyers XRCC1/Gy. Au bout de 24h après l'irradiation les CSB et les CDB sont quasiment toutes réparées et on retourne vers un niveau basal. Pour la simulation nous avons paramétré un nombre de cellule $N_c = 500$, elles sont ensuite distribuées sur le réseau carré et nous cherchons les probabilités p_1 , p_2 , r_1 et r_2 pour reproduire les données expérimentales. Nous utilisons un pas de temps $\Delta t = 1 \text{ min}$ et un temps total $t_{total} = 24h$. Nous paramétrons une dose de 2 Gy avec un débit de dose de 3 Gy/min. Ainsi dans la figure 4.4 nous pouvons voir deux histogrammes pour la création ($t < 0$) et la réparation ($t > 0$) des cassures doubles brins (histogramme bleu) et des cassures simples brins (histogramme rouge). L'objectif était de calibrer les probabilités p_1 et p_2 de création de CDB et CSB, ainsi que les probabilités r_1 et r_2 de réparation des CDB et CSB, en utilisant comme référence les données de la cinétique expérimentale. Nous trouvons la meilleure reproduction des données expérimentales pour $p_1 = 3.0 \times 10^{-4}$, $p_2 = 6.5 \times 10^{-4}$, $r_1 = 1.5 \times 10^{-3}$, $r_2 = 2.5 \times 10^{-3}$.

9.2.2 Induction de CDB selon la dose et vérification de la loi de Poisson

Dans le même cadre nous avons réalisé des simulations d'induction de cassures double-brin en fonction de la dose en prenant la probabilité $p_1 = 3.0 \times 10^{-4}$ qui permet de générer environ 15 CDB/cellule et pour 2 Gy et nous faisons varier le temps d'irradiation avec un débit de dose de 3 Gy/min. Nous obtenons la figure 9.2 pour des doses de 0.5, 1, 1.5 et 2 Gy. Nous représentons sur le même

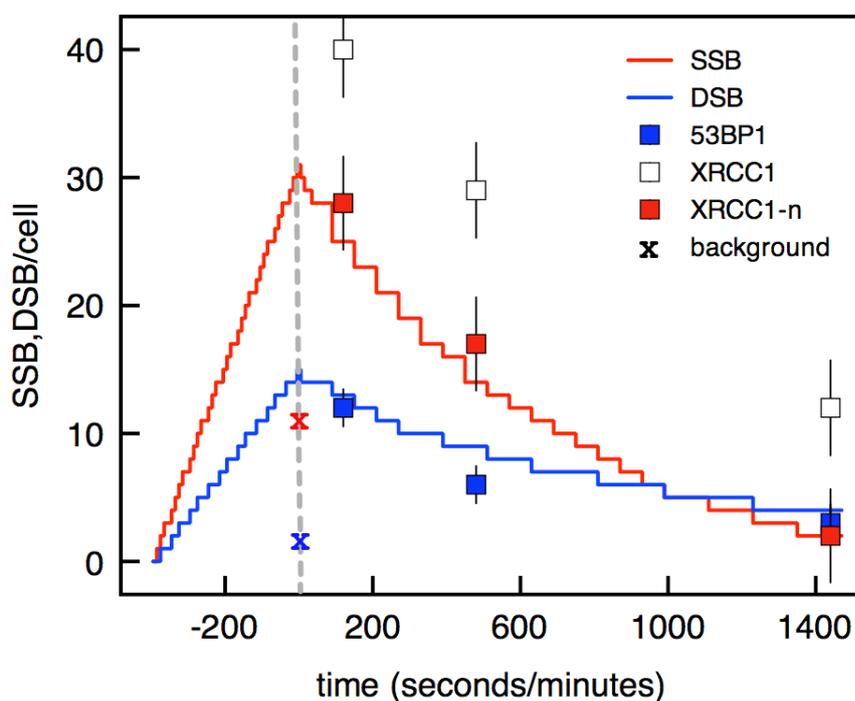


FIGURE 9.1 – Tracé du nombre expérimental de CDB (carrés bleus) et CSB (carrés rouges), après soustraction du bruit de fond et simulation irradiation+évolution de $\Delta=2$ Gy, par un faisceau de photons monochromatique de 20 MV (ligne pleine rouge : CSB et ligne pleine bleu : CDB). Le temps d'irradiation ($t < 0$) est en secondes, le temps suivant d'évolution ($t > 0$) est en minutes. Les probabilités d'endommagements $\{p_1, p_2\}$, et de réparations $\{r_1, r_2\}$, sont ajustées pour reproduire les données expérimentales.

graphique la loi de Poisson pour les différentes doses. Nous observons une très bonne superposition entre les points de la simulation et la loi de Poisson.

9.2.3 Effet d'une probabilité de réparation variable selon la phase du cycle cellulaire

Dans cette partie de calibration du modèle il a été question de tester la dépendance de la réparation des CDB avec la phase du cycle cellulaire. En effet il est connu que la radio-sensibilité des cellules est plus importante en phase S et moins importante en phase G2/M, avec une radio-sensibilité intermédiaire en phase G1 (DIKOMEY et al. 1998). Pour inclure la variation de radio-sensibilité dans notre modèle nous sommes parti sur l'hypothèse que les CDB sont plus ou moins vite réparées selon la phase du cycle cellulaire. Nous introduisons donc à cette effet une probabilité de réparation des CDB qui dépend du cycle cellulaire selon :

$$r_1 = \begin{cases} \phi r & \text{if } \phi \leq 2 \\ \frac{2}{3}r & \text{if } \phi > 2 \end{cases} \quad (9.14)$$

Une simulation utilisant ces différentes probabilités de réparation des CDB selon la phase a été réalisée. Nous avons testé la réparation des cassures double-brin pour des cellules uniquement en phase S, G1, G2-M, ainsi que pour un "mix" de cellules dispersées dans les phases S, G1 et G2-M. Nous avons pris la probabilité de réparation $r = 1.5 \times 10^{-3}$ comme précédemment. Cette simulation fait l'objet de la figure 9.3.

9.3 Mise à l'épreuve du modèle à l'aide de courbes de survie de cellules irradiées

Après la phase de calibration nous avons mis à l'épreuve notre modèle en confrontant nos simulations à des courbes expérimentales de survie cellulaire obtenues après irradiation. Pour ce faire dans un premier temps nous avons fait le

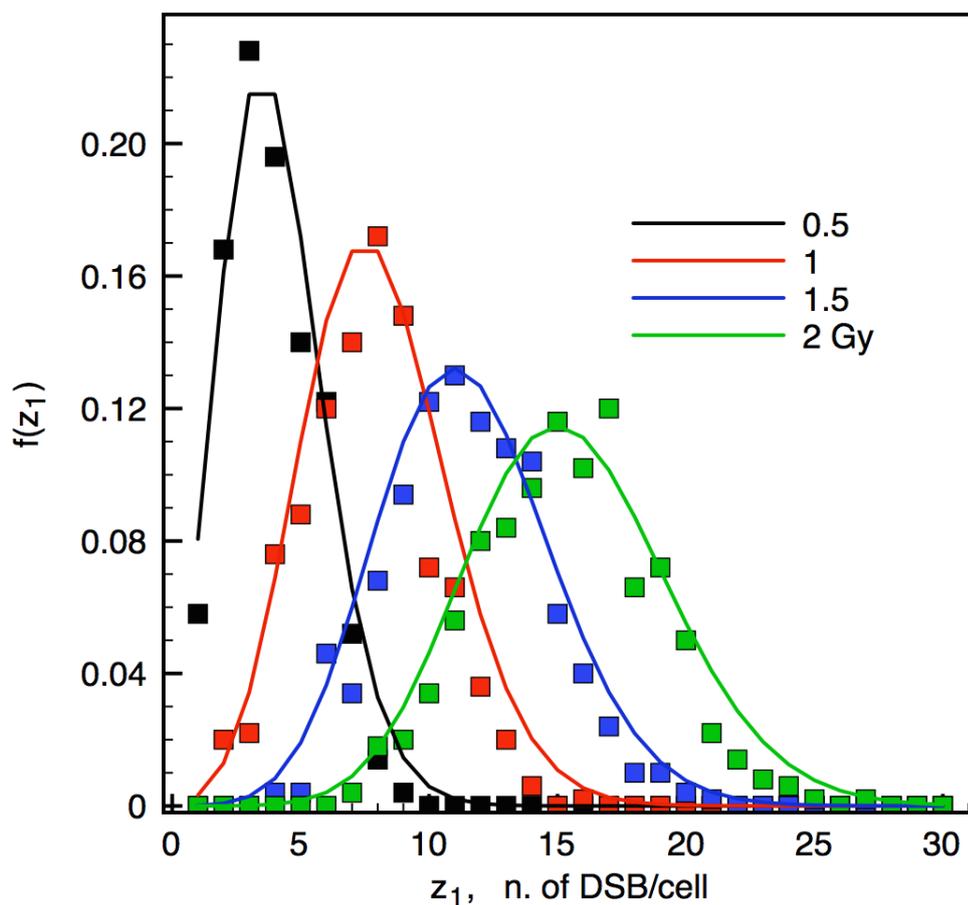


FIGURE 9.2 – Simulation de la fraction de CDB/cellule accumulées, z_1 , pour des valeurs de doses moyenne allant de 0.5 à 2 Gy. Le nombre total de cellules est $N_c=500$. Les symboles représentent les données brutes de la simulation MC ; les courbes continues représentent un ajustement des données expérimentales avec une loi de Poisson.

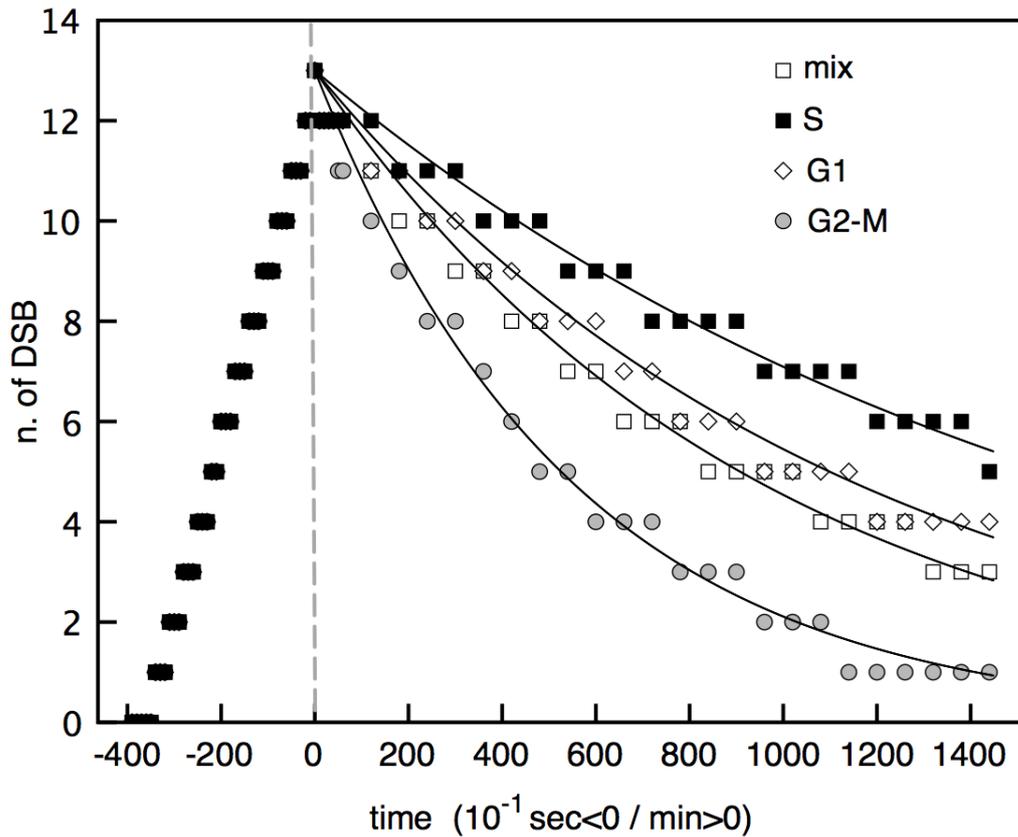


FIGURE 9.3 – Effet de l'inclusion d'une probabilité de réparation dépendante de la phase du cycle cellulaire (voir Eq.(9.14)). 'Mix' est la moyenne, avec réparation sur toutes les phases de la cellule; 'S', 'G1', 'G2-M' correspondent à une probabilité de réparation restreinte seulement à chaque phase cellulaire. Les courbes continues représentent un ajustement avec une fonction exponentielle pour chaque groupe de symbole.

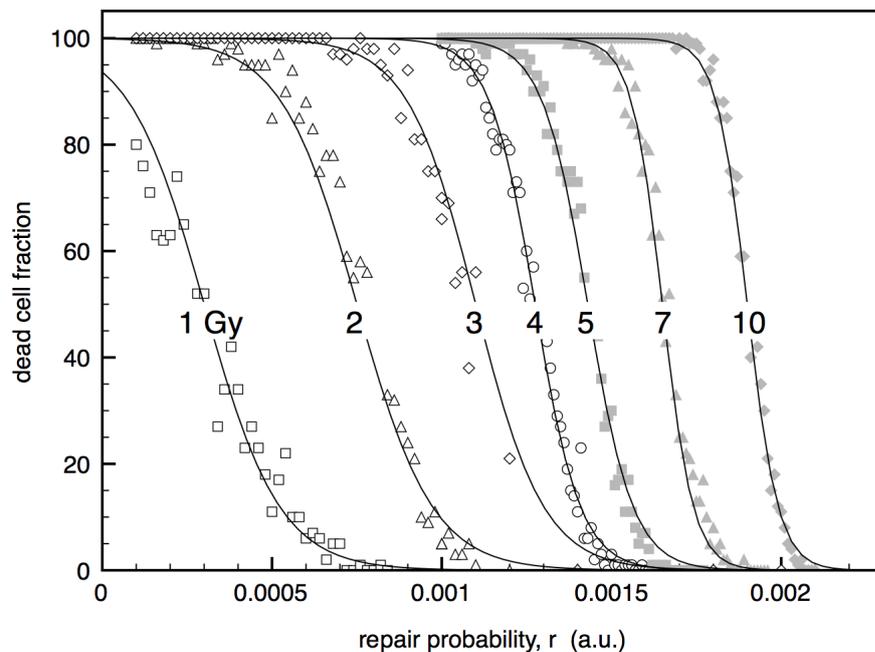


FIGURE 9.4 – Simulation de la fraction de mortalité cellulaire pour une colonie de $N=500$ cellules, en fonction de la probabilité de réparation des CDB r_1 , pour des irradiations simulées à $D = 1$ à 10 Gy (valeurs indiquées à côté de chaque groupe de données), toujours avec un débit de dose de 3 Gy/min. Les probabilités d'endommagements p_1, p_2 , et de réparation r_2 , sont fixées aux valeurs qui reproduisent les données expérimentales de la figure 9.1. Les cellules sont observées 24h après chaque irradiation et le seuil de mortalité est fixé à $N_{crit}=5$ CDB (voir Eq. (9.11)). Les courbes continues représentent le meilleur ajustement avec une fonction sigmoïde, pour chaque jeu de données de simulation.

choix de fixer le seuil d'endommagement critique N_{crit} et de mesurer la fraction de cellules survivantes en fonction de la dose d'irradiation et de la probabilité de réparation des CDB r_1 . Les autres propriétés de notre modèle ont déjà été explicitées précédemment. Rappelons cependant que les CDB sont générées de façon indépendante en suivant une statistique de Poisson, et elles sont réparées de manière exponentielle avec le temps. Aucun autre ajustement n'est nécessaire, puisque nous utilisons les valeurs de probabilité p_1, p_2, r_2 correspondant aux calibrations précédentes réalisées à partir de nos propres données expérimentales sur des NHDFs-F1MC irradiées à la dose de 2 Gy. De cette façon, nous cherchons à montrer (i) que le modèle est indépendant des données (puisque nous utilisons les données obtenues à partir d'une expérience particulière, pour reproduire des données obtenues dans des expériences entièrement différentes), et surtout (ii) que nous pouvons générer de manière autonome une réponse non prédéfinie, fournissant ainsi une interprétation biophysique aux données expérimentales. Nous avons donc construit avec les données de simulation la figure 9.4. Cette figure nous montre le pourcentage de cellules mortes en fonction de la valeur de la capacité de réparation r_1 , pour différents niveaux d'irradiation, à savoir $\Delta = 1, 2, 3, 4, 5, 7$ et 10 Gy, pour un débit de dose de 3 Gy/min. Dans ces simulations le seuil de mortalité est fixé à un niveau arbitraire $N_{crit} = 5$, ce qui signifie que en moyenne 5 CDBs dans une cellule sont suffisantes pour induire la mort de celle-ci. Le test sur l'état de la cellule est effectué 24h après l'irradiation. Pour ces simulations nous choisissons d'utiliser un taux de réparation indépendant de la phase du cycle cellulaire, c'est à dire le cas "mix" de la figure 9.3. Toutes les courbes des différentes simulations montrent le même comportement, à savoir la mortalité cellulaire est proche de 100 % pour les faibles valeurs de r_1 , et elle diminue rapidement autour d'une valeur critique de r_1 , en fonction de la dose. Avec l'augmentation de r_1 toutes les courbes finissent à la mortalité zéro, ce qui signifie que la probabilité de réparation devient assez grande pour permettre la réparation de toutes les CDBs générées par l'irradiation dans la fenêtre de temps de 24 heures. Notons ici que pour la plus faible dose simulée de 1 Gy, la fraction de mortalité ne démarre pas à 100, étant donné que le nombre de CDB générées par une telle petite dose est inférieure à $N_{crit}=5$.

Après cette première phase de simulation il a été question de chercher des

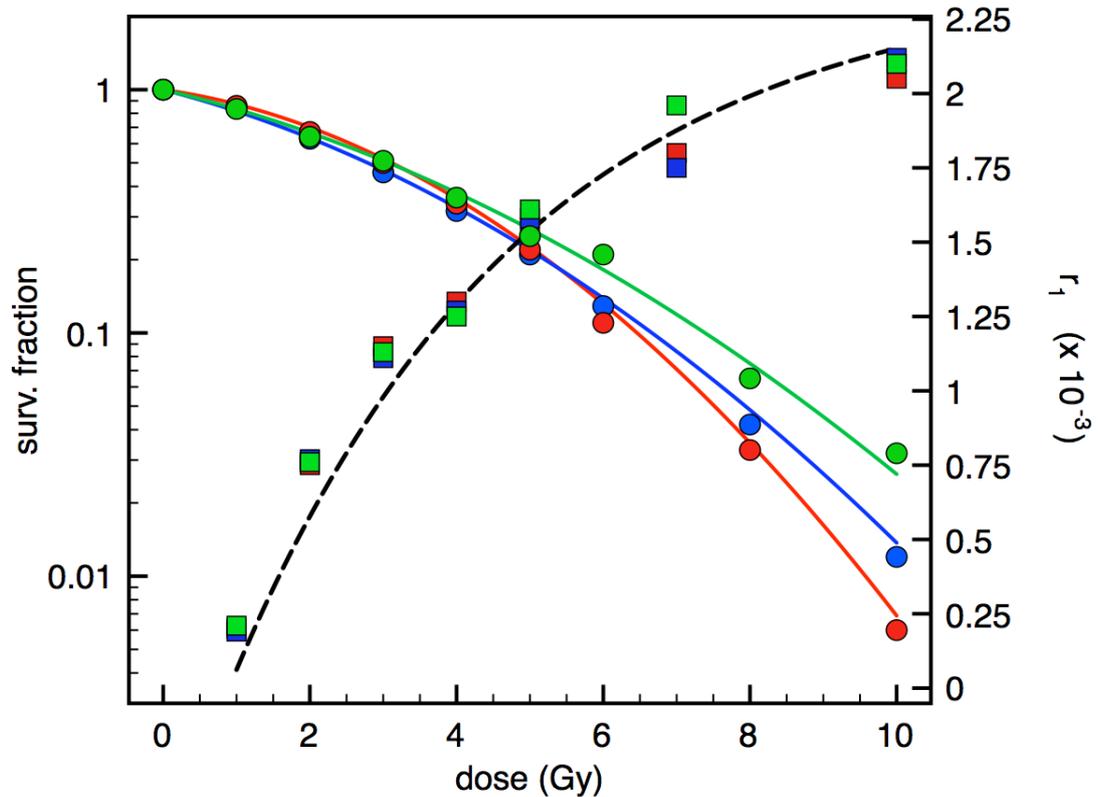


FIGURE 9.5 – Ordonné de gauche : Tracé de données expérimentales pour la fraction de survie de cellules V79 (cercles bleus) et de cellules FaDu (cercles rouges) (SORENSEN et al. 2011), et pour des cellules X1 (cercle vert) (MA et al. 2013). Les courbes continues représentent les données de simulation MC. Ordonnée de droite : valeur de la probabilité de réparation r_1 extrait de la simulation figure 9.4 qui donne la meilleure approximation pour chaque courbe de survie expérimentale. Les carrés en couleurs correspondent à chaque valeur expérimentale (Une couleur correspond à un couple simulation-expérience). La ligne en tirets représente le fit exponentiel à toutes les valeurs r_1 (voir Eq. 9.15).

courbes de survie cellulaire expérimentales déjà publiées, et de comparer les données avec nos données de simulation de la figure 9.4. Concrètement, pour chaque valeur de dose Δ , nous extrayons de la courbe 9.4 la valeur de r_1 qui permet de retrouver la valeur de mortalité de la courbe de survie expérimentale. Les résultats de cette analyse sont reportés dans la figure 9.5. Nous avons utilisé trois courbes de survies expérimentales, deux proviennent des travaux de (SORENSEN et al. 2011) et ont été obtenues en irradiant des cellules de hamster chinois V79 (points bleue) et FaDu (points rouge) avec un Linac et un débit de dose de 5.01, 9.99 et 29.91 Gy/min. La dernière courbe de survie expérimentale provient des travaux de (MA et al. 2013) et a été obtenue en irradiant des cellules de hamster chinois X1, avec un tube à rayons X de 250 kV. Les trois courbes en trait plein de la figure 9.5 représentent la capacité de notre modèle à reproduire correctement les données expérimentales.

De plus dans la même figure 9.5, nous avons rapporté les valeurs de la probabilité de réparation r_1 qui donnent pour chaque valeur de dose la survie cellulaire la plus proche des données expérimentales, et ceci pour chacune des trois courbes expérimentales (carré bleu pour les V79, carré rouge pour les FaDu et carré vert pour les X1). Nous pouvons donc voir que les valeurs de r_1 permettant de reproduire les données expérimentales ne sont pas les mêmes en fonction de la dose, mais augmentent progressivement aux faibles doses pour atteindre une valeur constante (autour de $r_1 \sim 2.4 \times 10^{-3}$) aux doses plus élevées. La courbe en pointillé représente la loi exponentielle qui permet de reproduire au mieux le comportement de r_1 avec la dose. Cette loi exponentielle peut s'écrire comme :

$$r_1 = a - b \exp(-cD) \quad (9.15)$$

avec $a=2.4$, $b=3$ et $c=0.25$

9.4 Effet de la variation du N_{crit} sur la survie cellulaire

Dans cette partie, l'objectif était d'évaluer l'impact du N_{crit} sur la fraction de mortalité après irradiation. Pour se faire nous avons réalisé un ensemble

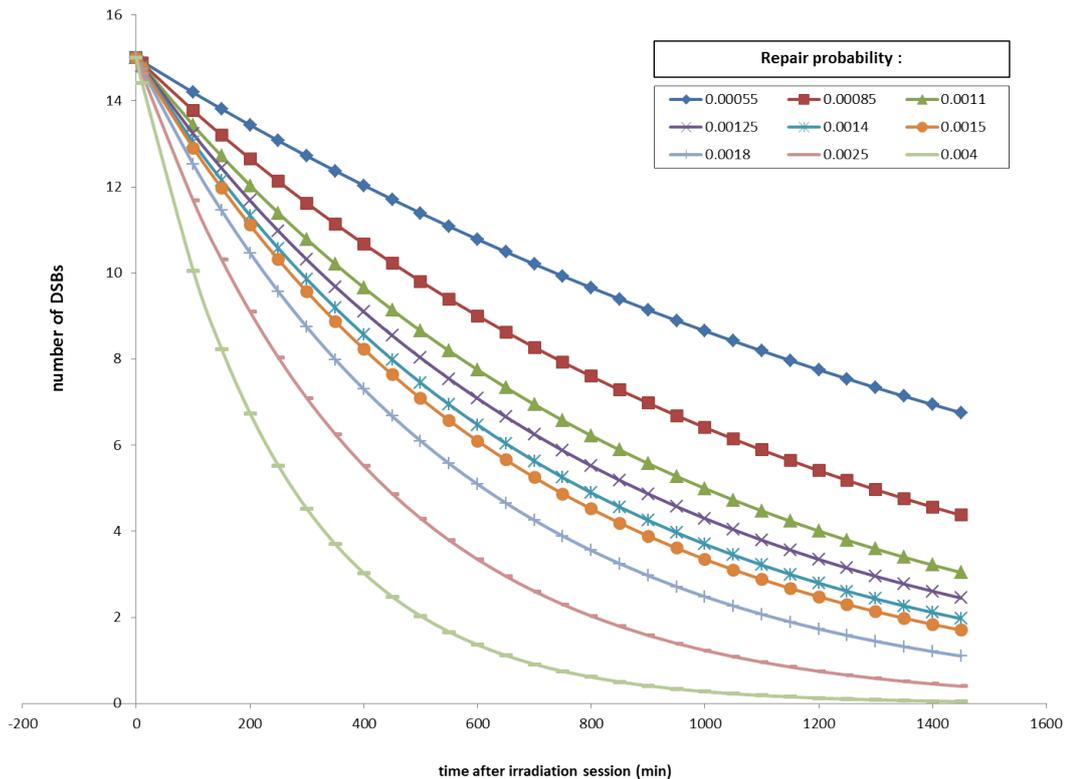


FIGURE 9.6 – Simulation de la réparation des CDB en fonction du temps pour une colonie de $N=500$ cellules et pour différentes probabilités de réparation des CDB r_1 allant de 5.5×10^{-4} à 4.0×10^{-3} . Les cellules sont observées pendant 24h avec un point de simulation chaque minute.

de simulations en faisant varier à la fois le N_{crit} , mais aussi la probabilité de réparation des CDB r_1 qui représente la capacité de réparation des cellules, ainsi que la dose en Gy.

Cette partie du travail vient en complément de l'article publié dans "Journal of Theoretical Biology" (TOMEZAK et al. 2016)

9.4.1 Effet de la probabilité de réparation sur la cinétique de réparation des CDB

La première étape de cette simulation a consisté à réaliser des simulations permettant de visualiser l'impact de la probabilité de réparation r_1 sur la ciné-

tique de réparation. La simulation a été générée pour 15 CDB (quantité générée après une dose de 2Gy). Afin de balayer au mieux les différentes possibilités, nous avons choisi 9 probabilités : $r_1 = 0.00055, 0.00085, 0.0011, 0.00125, 0.0014, 0.0015, 0.0018, 0.0025$ et 0.004 . Les résultats de cette simulation sont regroupés dans la figure 9.6.

Comme attendu, la réparation est d'autant plus rapide et importante sur le temps considéré que la probabilité de réparation de la loi exponentielle est grande. Ainsi si on regarde le nombre de CDBs restantes après 24h, on observe pour la probabilité $r_1 = 0.004$ qu'elles ont toutes été réparées et pour $r_1 = 0.00055$ qu'il en reste encore environ 8 par cellule.

9.4.2 Fraction de mortalité en fonction du N_{crit}

Dans cette deuxième étape, il a été question d'évaluer la fraction de mortalité en faisant varier d'une part la dose, d'autre part la probabilité de réparation r_1 et surtout le N_{crit} . Nous avons choisi successivement une dose $\Delta = 1, 2, 3, 4, 5, 7$ et 10 Gy. Les valeurs de r_1 sont les mêmes que dans la figure 9.6. La figure 9.7 nous montre le pourcentage de cellules mortes en fonction du N_{crit} , pour les différents niveaux d'irradiation et pour les différentes probabilités r_1 . Le débit de dose est le même que les simulations précédentes à savoir 3 Gy/min. Le test sur l'état de la cellule est effectué 24h après l'irradiation. Le taux de réparation utilisé est celui indépendant de la phase du cycle cellulaire, c'est à dire que cas "mix" de la figure 9.3. La figure 9.8 nous montre le pourcentage de cellules mortes en fonction du N_{crit} , pour les différents niveaux d'irradiation et pour deux valeurs de probabilité choisies qui sont $r_1 = 0.00055$ et $r_1 = 0.0015$. Ceci dans le but de regrouper les résultats des différentes doses dans un même graphique.

Ainsi la figure 9.7 nous montre que toutes les courbes des différentes simulations ont le même comportement, à savoir que la mortalité est proche de 100 % pour des faibles valeurs de N_{crit} , et que celle-ci diminue rapidement autour d'une valeur critique de N_{crit} , en fonction de la dose et aussi de la probabilité r_1 . Avec l'augmentation de N_{crit} toutes les courbes finissent à la mortalité zéro, ce qui signifie que les cellules ont suffisamment de résistance aux CDB pour ne pas mourir. Notons que, pour certaines probabilité et dose, la fraction de mortalité

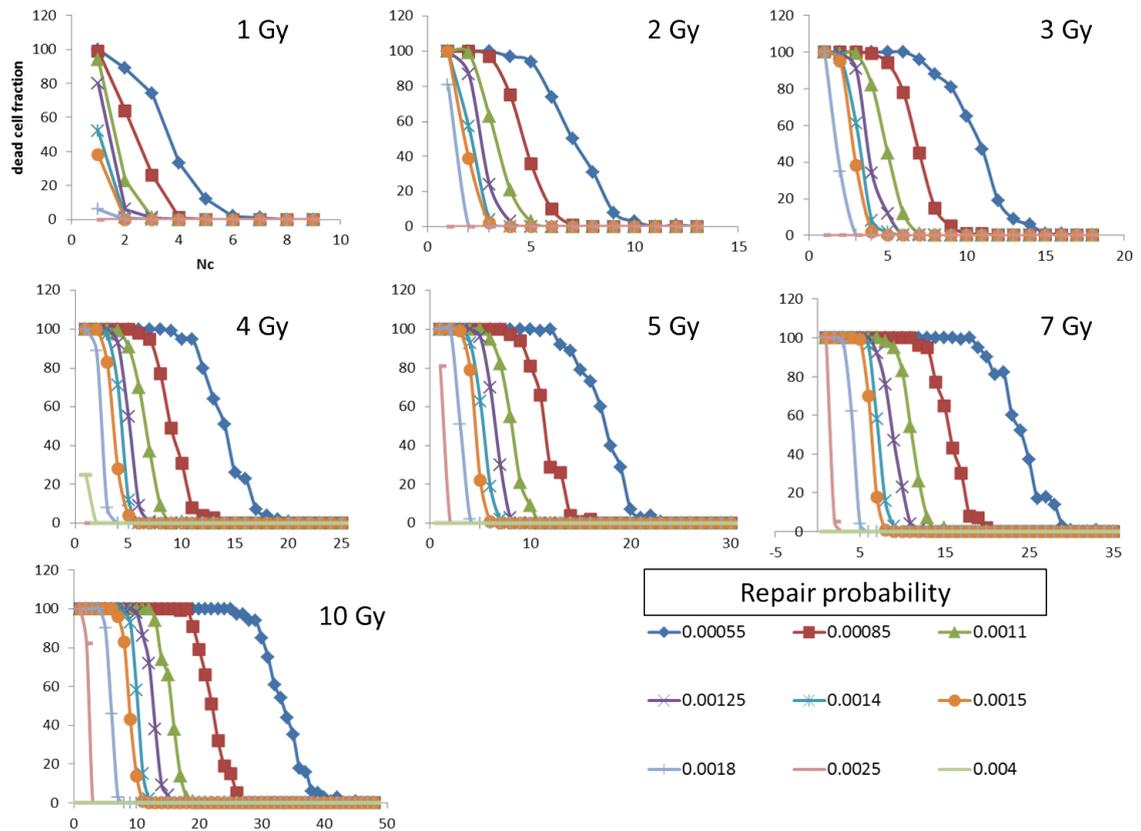


FIGURE 9.7 – Simulation de la fraction de mortalité cellulaire pour une colonie de $N = 500$ cellules, en fonction du Nombre critique (N_c) pour différentes probabilités de réparation des CDB r_1 allant de 5.5×10^{-4} à 4.0×10^{-3} et pour différentes doses (1, 2, 3, 4, 5, 7, 10 Gy), toujours avec un débit de dose de 3 Gy/min. Les probabilités d'endommagements p_1 , p_2 , et de réparation r_2 , sont fixées aux valeurs qui reproduisent les données expérimentales de la figure 9.1. Les cellules sont observées 24h après chaque irradiation. Chaque panel représente le résultat des simulations pour une dose donnée.

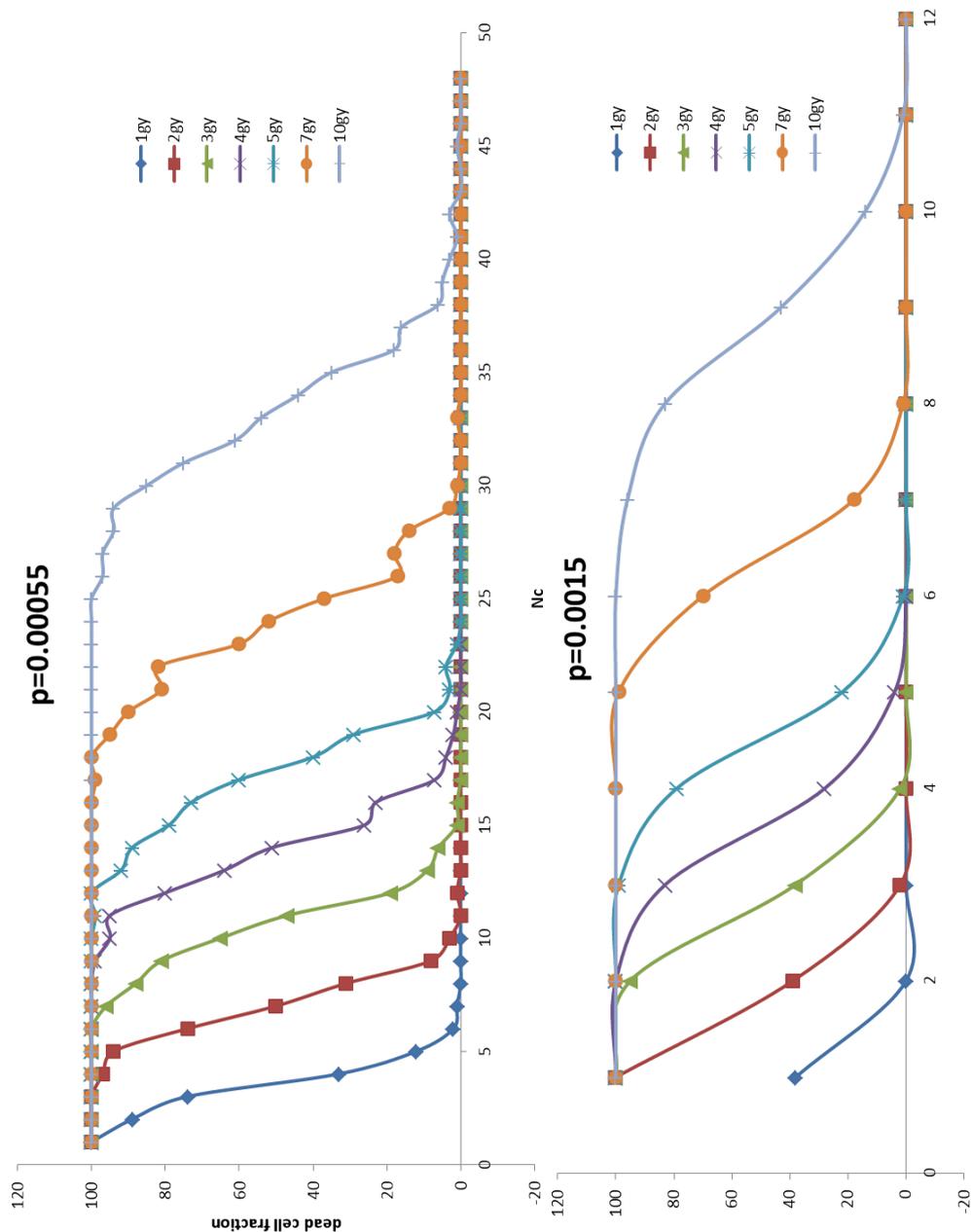


FIGURE 9.8 – Simulation de la fraction de mortalité cellulaire pour une colonie de $N = 500$ cellules, en fonction du Nombre critique (N_c) pour deux probabilités de réparation des CDB r_1 qui sont : 5.5×10^{-4} et 1.5×10^{-3} et pour différentes doses (1,2,3,4,5,7,10 Gy), toujours avec un débit de dose de 3 Gy/min. Les probabilités d'endommagements p_1, p_2 , et de réparation r_2 , sont fixées aux valeurs qui reproduisent les données expérimentales de la figure 9.1. Les cellules sont observées 24h après chaque irradiation. Chaque panel représente le résultat des simulations pour la probabilité donnée.

ne démarre pas à 100. Ceci est dû au fait que la quantité de CDB générées n'est pas suffisante dans ces cas-ci pour induire la mortalité de toutes les cellules même avec un N_{crit} faible.

La figure 9.8 nous montre différemment les mêmes résultats, en effet cette fois-ci on regroupe les différentes doses dans une même figure plutôt que les différentes probabilité. Ainsi cette figure est très similaire à la figure 9.4. En effet on obtient le même comportement à ceci près que la variable n'est pas la même. Pour l'une N_{crit} était fixe et r_1 variable, ici c'est le contraire à savoir r_1 fixe et N_{crit} variable. Encore une fois et comme précédemment, toutes les courbes des différentes simulation ont le même comportement. La valeur du N_{crit} autour de laquelle la fraction de mortalité varie fortement augmente avec la dose. Également cette valeur est d'autant plus importante que la probabilité de réparation est faible.

En conclusion de ces simulations nous pouvons dire que pour une probabilité de réparation donnée, c'est la valeur du N_{crit} qui indique la résistance des cellules à l'irradiation. De cette façon plus la dose est forte et plus les cellules qui survivent doivent avoir une grande résistance aux CDB. De plus et ceci logiquement, plus la capacité de réparation est faible et plus cette résistance doit être élevée, c'est pourquoi pour une même dose et pour des r_1 différents le N_{crit} permettant d'obtenir une mortalité similaire n'est pas le même.

La similarité entre les deux résultats se prête à quelque forme de spéculation. Dans le cas d'une probabilité de réparation variable, on imagine que le phénomène étant à la base de la variation rapide de la mortalité avec la dose (le facteur quadratique β donnant origine de l' "épaule" dans la courbe de survie, inexplicable autre que empiriquement dans les modèles balistiques) serait due à une sorte de "saturation" de la capacité cellulaire. Aux faibles doses, chaque cellule engage un nombre de protéines de réparation proportionnelle au nombre de dégâts, d'où la croissance quasi-linéaire de r ; ensuite, r décline et augmente de manière fortement sub-linéaire, ce qui correspondrait à un réservoir fini de protéines, qui ne peuvent pas être ultérieurement engagées alors que le taux de dommages augmente.

Dans le cas de N_{crit} variable, l'hypothèse biophysique différente. Ici on voit plutôt les cellules s'adapter avec des taux de mortalité différents en fonction de la

dose croissante, comme si la réponse cellulaire était progressive, et augmenterait pour des doses de plus en plus "dangereuses". Il est possible que des cellules de types différents adoptent l'une ou l'autre stratégie, ou bien une combinaison des deux. Ou encore des stratégies différentes, pour résister à la radiation ionisante. Dans tous les cas, on voit ici l'utilité d'un tel modèle, qui permet de tester des hypothèses biophysiques et biologiques diverses, allant au delà du simple empirisme.

9.5 Application du modèle à l'effet bystander en radiobiologie : diffusion à longue portée versus diffusion à courte portée

L'effet bystander induit par les rayonnements ionisants est un phénomène par lequel des effets cellulaires et des dommages cellulaires (échanges de chromatides soeurs, aberrations chromosomiques, apoptose, micronucléation, transformation, mutations et expression de gène) peuvent apparaître dans des cellules voisines non irradiées à proximité de cellules irradiées (AZZAM et al. 1998). Cet effet peut se produire dans des conditions très différentes, à la fois "in vitro" et "in vivo" et peut être généré selon deux processus différents, à savoir par un processus local sur une distance cellule-cellule mais aussi par un processus global sur de plus longues distances. Les effets cellulaires d'une telle action "bystander" sont une diminution ou une augmentation de la capacité répliquative des cellules non-irradiées, voire aussi de la mortalité cellulaire (GERASHCHENKO et HOWELL 2005). Cette dernière constatation motive une seconde application de notre modèle, afin de montrer l'importance de coupler la génération et la réparation des dommages avec les phénomènes de diffusion et la cartographie des cellules.

Dans le but de simuler l'effet du facteur "bystander" B sur les cellules non irradiées nous introduisons deux équations supplémentaires à notre modèle. Ces deux équations permettent de simuler les différents cas de figures, à savoir une augmentation de la prolifération, un arrêt de la prolifération et la mortalité cellulaire. La première des équations permet de faire le lien entre la concentration

du facteur "B" et le temps local de la cellule :

$$t_{d'} = t_d + \Delta t(1 + \gamma c^B) \quad (9.16)$$

Avec γ un facteur d'efficacité empirique qui selon la valeur permet de simuler une augmentation de la prolifération ou un arrêt de la prolifération. En effet pour un facteur γ allant de 0.1 à 2 nous pouvons simuler le fait qu'une accumulation du facteur B dans les cellules vient anticiper le moment auquel la cellule effectue sa division. Autrement dit, si nous prenons un facteur $\gamma = -0.5$ ou -1 , nous pouvons simuler le fait qu'une accumulation du facteur B dans une cellule vient retarder le moment auquel la cellule effectue sa division, ce qui correspond pour nous à un pseudo-arrêt de prolifération.

La deuxième équation relie cette fois ci la concentration du facteur "B" avec la mortalité cellulaire. Nous introduisons une nouvelle probabilité de mortalité qui est fonction de la concentration du facteur "B" :

$$P_{mort} = \frac{1}{1 + e^{-100(c^B - 0.9)}} \quad (9.17)$$

Nous comprenons aisément dans cette formule que l'augmentation de la concentration du facteur B dans les cellules augmente la probabilité que la cellule a de mourir. Nous simulons dans ce cas l'effet d'une espèce chimique qui induit une létalité cellulaire.

Nous avons donc réalisé des séries de simulation qui couplent irradiation et diffusion sur une colonie de 500 cellules, avec les mêmes paramètres que dans les précédentes simulations. Pour simuler une co-culture de cellules irradiées et non-irradiées nous construisons un tapis cellulaire de 500 cellules avec 5, 10, 20, 50, 75, et 90 % de cellules irradiées placées de manière aléatoire selon le protocole décrit précédemment. L'effet "bystander" a été simulé selon les deux variantes proposées ci-dessus, à savoir un effet "bystander" local versus un effet "bystander" global. Pour modéliser l'effet des cellules irradiées sur les cellules non irradiées, nous introduisons un facteur labellisé "B" qui diffuse à partir des cellules irradiées. De cette manière la concentration du facteur B , c^B augmente à chaque pas de temps selon l'équation de diffusion 9.13. Nous fixons les paramètres de concentration du facteur pour avoir un terme source constant

$s^B = 1$ dans les cellules irradiées et un terme source $s^B = 0$ dans les cellules non irradiées. De cette manière le facteur "B" diffuse des cellules irradiées vers les cellules non irradiées plus ou moins vite selon la valeur du coefficient de diffusion D . Grâce à la valeur du coefficient de diffusion D nous allons pouvoir simuler l'effet local versus l'effet global. En effet pour la version "local" nous assignons un coefficient de diffusion $D^B=1$ et $D^B \simeq 0$ (unité arbitraire et normalisé) pour les cellules irradiées et les cellules non irradiées respectivement. Autrement dit, pour la version "global" de l'effet "bystander" nous assignons un coefficient de diffusion $D^B=1$ pour les cellules irradiées et nous testons des valeurs croissantes $D^B=10^{-3}$, 10^{-2} , ou 10^{-1} pour les cellules non irradiées. Un exemple graphique est proposé à la figure 9.9, dans le but de montrer l'effet de ces différentes valeurs du coefficient de diffusion sur la présence du facteur B dans les cellules non irradiées après 0, 1, 2 et 24h.

Les résultats des simulations effectuées dans ce cadre sont reportées dans les figures 9.10 et 9.11. La figure 9.10 montre le taux de duplication des cellules non irradiées après 24h, pour une colonie de 500 cellules dans laquelle il y a une proportion variable de cellules irradiées (axe des abscisses) en contact avec les cellules non irradiées. Les deux types de cellules sont placées de manière aléatoire dans la grille 2D. les quatre graphiques correspondent aux quatre valeurs du coefficient de diffusion, à savoir $D^B \simeq 0, =0.001, 0.01, 0.1$. Les différentes courbes dans chaque graphique correspondent aux différentes valeurs test de γ , qui est rappelons le, le coefficient mettant en relation la concentration du facteur B avec le taux de prolifération des cellules non irradiées à travers l'équation (9.16). Nous ajoutons également la courbe labellisée m qui correspond au cas où le facteur B induit la mortalité cellulaire à travers la probabilité de mortalité décrite par l'équation 9.17.

Déjà au travers de la figure 9.10 nous pouvons voir que les différentes courbes de chaque graphique ont la même tendance. A savoir elles montrent toutes une augmentation du taux de prolifération comme étant une fonction du facteur γ (le taux normal de prolifération en l'absence d'irradiation étant de 2 après 24h). Pour γ proche de zéro, le taux de prolifération reste quasiment constant (= 2) quelque soit le pourcentage de cellules irradiées. Et nous observons qu'une valeur négative de γ réduit bien la capacité de prolifération, pour atteindre la

valeur limite de 1 (c'est-à-dire pratiquement aucune division dans les 24h) pour $\gamma = 1$ et un pourcentage de cellules irradiées suffisant. Pour le cas où le facteur B induit la mortalité cellulaire, nous pouvons voir qu'il est possible de tuer complètement les cellules après 24h, c'est à dire ramener le taux de prolifération à la valeur 0.

Concernant les différences entre effet "local" et effet "global" nous pouvons tout de même noter des différences de comportement. Premièrement dans ce dernier cas où le facteur B induit de la mortalité nous pouvons mettre en évidence une différence selon la valeur du coefficient de diffusion. En effet pour les petites valeurs de D^B le taux de mortalité est quasiment exponentiel avec la quantité de cellules irradiées dans la colonie, tandis que pour les grandes valeurs de D^B l'efficacité de diffusion du facteur toxique est telle que pour 10 à 20 % de cellules irradiées toutes les cellules en contact sont déjà tuées et le taux de prolifération est donc proche de 0. De la même manière en se focalisant sur la comparaison des graphiques pour $D^B \simeq 0$ et $D^B = 0.1$ nous pouvons remarquer la différence entre un effet "local" de la diffusion versus un effet "global" de la diffusion. En effet il existe clairement une dépendance du taux de prolifération en fonction de la quantité de cellules irradiées dans l'échantillon pour l'effet "local", que l'on ne retrouve quasiment pas dans l'effet "global" (pour $D = 0.1$) car chacune des courbes atteint, déjà à partir de 10% de cellules irradiées, son régime de saturation.

La figure 9.10 nous montre plus clairement les différences existantes entre l'effet "local" et l'effet "global" de la diffusion sur l'effet bystander. Le graphique représente deux familles de courbes pour deux valeurs extrêmes de la fraction de cellules irradiées dans la colonie, à savoir 5% (courbes rouges en pointillées) et 75% (courbes noires en traits pleins). Les différentes courbes de chaque famille correspondent aux différentes valeurs de γ de la précédente figure 9.10. Dans cette figure nous représentons en abscisse la valeur du coefficient de diffusion D^B (échelle logarithmique) et en ordonnée le taux de prolifération comme pour la figure 9.10. Grâce à cette façon de présenter les résultats nous pouvons plus clairement apprécier que pour les colonies de cellules qui présentent une forte fraction de cellules irradiées, les résultats sont quasi-indépendant de la valeur du coefficient de diffusion, et que le paramètre principal est la valeur de γ . A

contrario, pour les colonies de cellules qui présentent une faible fraction de cellules irradiées, il existe une dépendance des résultats en fonction de la valeur du coefficient de diffusion D^B . Ainsi pour ce dernier cas l'effet bystander sur diffusion "global" conduit à une variation du taux de prolifération plus important qu'avec un effet bystander sur diffusion "local".

Un tel résultat du modèle n'est pas du tout surprenant, et aurait pu être facilement prédit simplement sur la base d'un raisonnement logique : si le nombre de «source» (c'est à dire de cellules irradiées) est grand, il n'y a pratiquement pas de différence entre une action locale et globale mais si le nombre de cellules "source" est très faible, alors, une action globale est nécessairement plus efficace qu'une action locale, pour un laps de temps donné. Même si de toute évidence la représentation de l'effet "bystander" tel que nous l'avons conçu dans cette partie est simpliste, ces différentes simulations nous indiquent que le modèle fonctionne correctement. Nous l'avons utilisé ici dans le but de démontrer les possibilités d'un tel modèle théorique d'évolution cellulaire à reproduire une diversité de comportement.

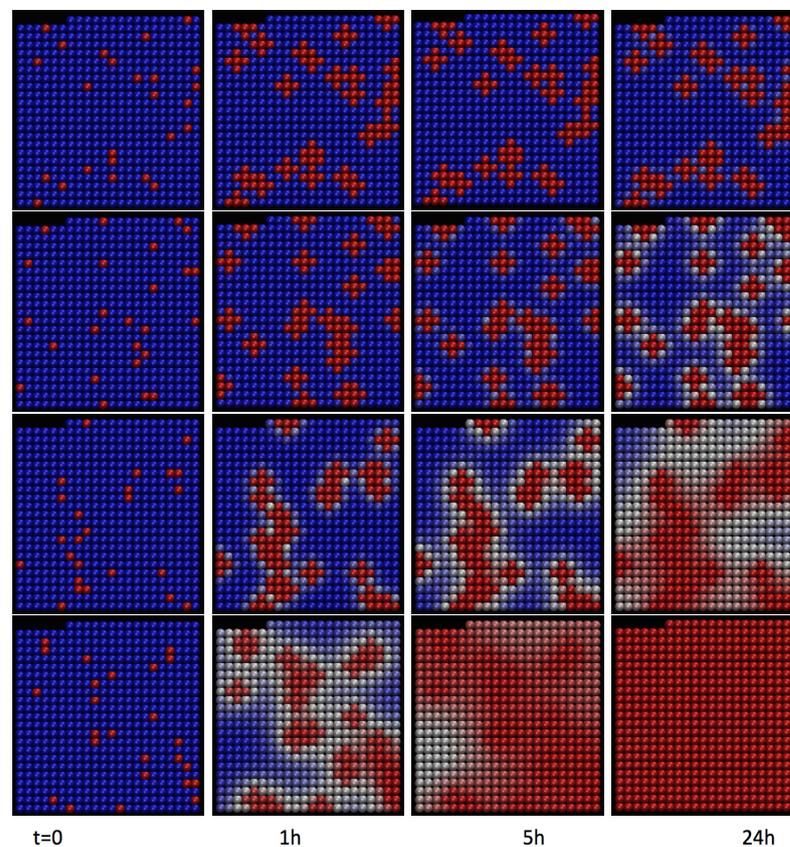


FIGURE 9.9 – Carte de concentration pour la simulation de l'effet "bystander" dans une colonie de 500 cellules avec une distribution aléatoire de 5% de cellules préalablement irradiées. Du haut vers le bas le coefficient de diffusion pour les cellules non irradiées varie comme $D^B \sim 0, 0.001, 0.01, 0.1$. Les quatre cartes en haut ($D^B=0$) représentent un effet "bystander local" avec diffusion limitée seulement entre cellules voisines. Les cartes pour les trois lignes du bas ($D^B > 0$) simule un effet global, avec de la diffusion dans le milieu extra-cellulaire croissante. Les colonnes de gauche à droite correspondent à des instants de simulation $t=0, 1, 5, 24h$. Le code couleur continu représente la concentration du facteur pro-mitogénique accumulé dans chaque cellule (bleu $c^B=0$, blanc $c^B=0.5$, rouge $c^B=1$).

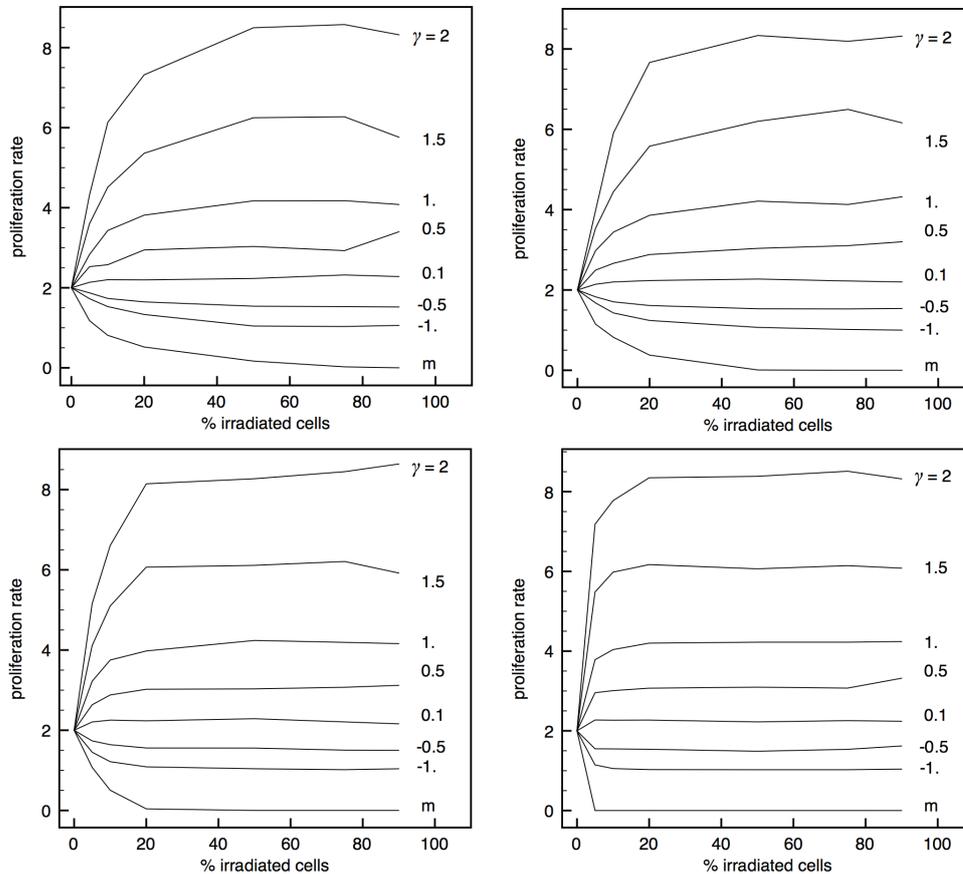


FIGURE 9.10 – Simulation du taux de duplication de cellules non-irradiées après 24h, dans une colonie de 500 cellules, comprenant des fractions de cellules préalablement irradiées allant de 5 à 90%. Un taux de duplication normal correspond à 2. Dans chaque simulation, le coefficient de diffusion pour les cellules irradiées est toujours $D^B=1$. Par contre la diffusion pour les cellules non-irradiées est différent dans chaque panel. En haut, gauche $D^B \sim 0$, droite $D^B=0.001$; en bas, gauche $D^B=0.01$, droite $D^B=0.1$. Chacune des courbes correspond à des valeurs différentes du γ dans Eq.(9.16), à l'exception de la courbe "m", correspondant à la décroissance de la population en présence du facteur apoptotique dans Eq.(9.17).

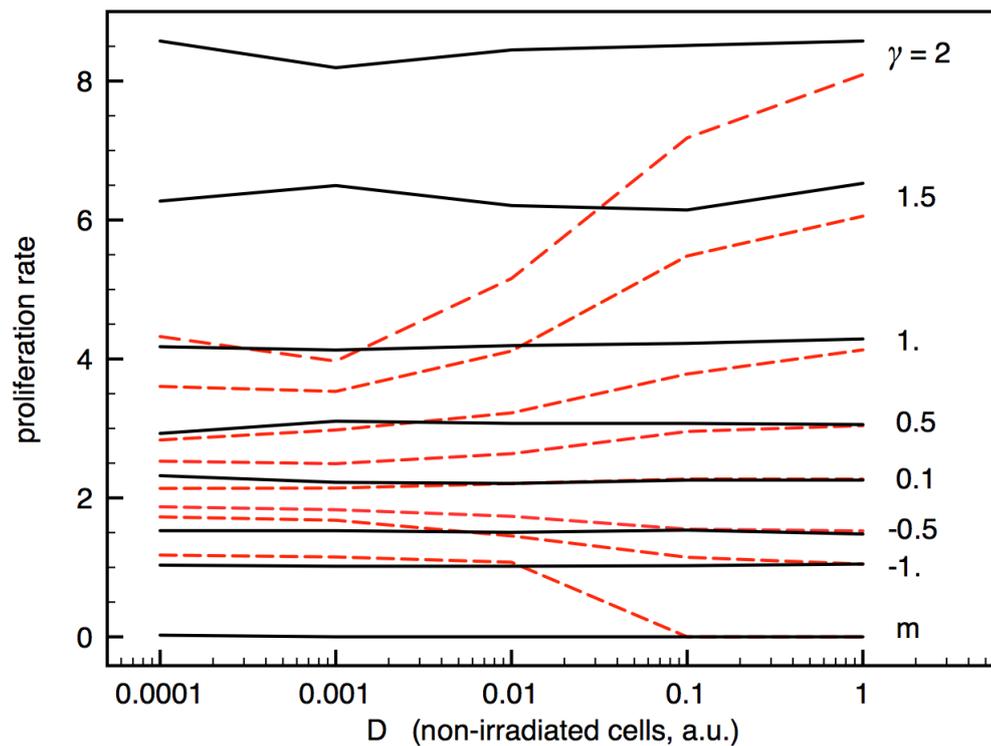


FIGURE 9.11 – Simulation du taux de duplication de cellules non-irradiées après 24h, dans une colonie de 500 cellules, incluant 5% (rouge pointillé) ou 75% (noir continu) de cellules irradiées préalablement. Ce sont les mêmes données que pour la figure 9.10 mais représentées en fonction du coefficient de diffusion des cellules non-irradiées. Les différentes paires de courbes rouge-noire correspondent aux valeurs différentes de γ dans Eq.(9.16).

Chapitre 10

Conclusion/Discussion sur le modèle

Dans cette partie et ce travail de simulation informatique, nous avons développé et testé un modèle d'évolution cellulaire multi-agents ("agent-based model"). Celui-ci a pour objectif de suivre l'évolution d'une population de cellules soumises à un traitement cytotoxique. Pour ce faire nous avons inclus les différentes caractéristiques principales de la vie cellulaire, à savoir le cycle et la prolifération, l'endommagement et la réparation de l'ADN, mais aussi la diffusion d'espèces chimiques. Dans le développement effectué dans le cadre de ma thèse, les cellules (ou agents) évoluent dans un réseau bidimensionnel avec quatre voisins directs (haut, bas, gauche et droite). L'évolution des dommages consécutifs à l'irradiation a été modélisée mathématiquement par une chaîne de Markov, avec les cellules qui peuvent passer d'un état "normal ou sain" à un état endommagé jusqu'à un état "mort ou inactif". En plus de la mathématique de Markov pour l'endommagement, des lois probabilistes ont été introduites afin de prendre en compte tous les types d'événements qu'une cellule peut subir au cours de son cycle de vie. Ainsi la duplication, l'arrêt dans le cycle, la mort, la sénescence, la transformation néoplasique sont des états par lesquels une cellule du modèle peut passer. La dynamique cellulaire a été simulée à l'aide d'un algorithme Monte Carlo.

La toute première étape après avoir développé le logiciel de simulation a été de calibrer quelques uns des paramètres avec une série d'expériences d'irradiations. Comme pour la première partie, ces irradiations ont été réalisées

avec une machine CLINAC dédiée au traitement des patients en radiothérapie. Nous avons réalisé un suivi de la quantité de cassures simples et doubles brins par l'intermédiaire des protéines XRCC1 et 53BP1 pour une irradiation en plein champ. Ces données sur la quantité de dommages CSB et CDB ainsi que sur leur vitesse de réparation ont été utilisées pour calibrer les probabilités associées à la dynamique de Markov d'endommagement et de réparation.

Après cette phase de calibration il a été question d'utiliser le modèle pour retrouver des courbes de survie cellulaire déjà publiées. De telles courbes sont généralement interprétées sur la base du modèle "linéaire-quadratique" qui pré-suppose que la mortalité se produit suite à la survenue d'un seul événement létal ou de deux événements sublétaux. Avec notre modèle, nous obtenons une très bonne correspondance entre les données expérimentales et de simulation, et ceci sans mettre en jeu d'hypothèse sur la génération des CDB ou autre. En fait pour reproduire les courbes de survie nous avons la possibilité de faire varier deux paramètres qui sont :

- 1- La capacité de réparation des CDB
- 2- Le nombre critique de CDB au delà duquel la cellule meurt.

L'ensemble des simulations nous indiquent deux points fondamentaux concernant la résistance des cellules à l'augmentation de la dose :

- Si nous fixons le N_{crit} , plus la dose est forte et plus les cellules doivent avoir une capacité de réparation élevée pour avoir une chance de survivre. Cette capacité de réparation doit être en mesure de réparer les CDB avant de dépasser le niveau critique conduisant à la mort de la cellule. Nos simulations montrent que la capacité de réparation augmente de façon proportionnelle jusqu'à des faibles doses ($<2\text{Gy}$), suivi par une saturation à une valeur critique exponentielle. (voir figure 9.5)
- Inversement si la capacité de réparation ne varie pas, pour que les cellules survivent, les simulations montrent que la cellule doit être en mesure d'absorber un nombre de CDBs important sans déclencher un mécanisme de mort quel qu'il soit.

Dans un autre test, nous avons tenté de simuler un effet connu en radiothérapie qui est l'effet "bystander". Cet effet décrit la possibilité que les cellules non-irradiées à proximité des cellules irradiées ont d'avoir une réponse méta-

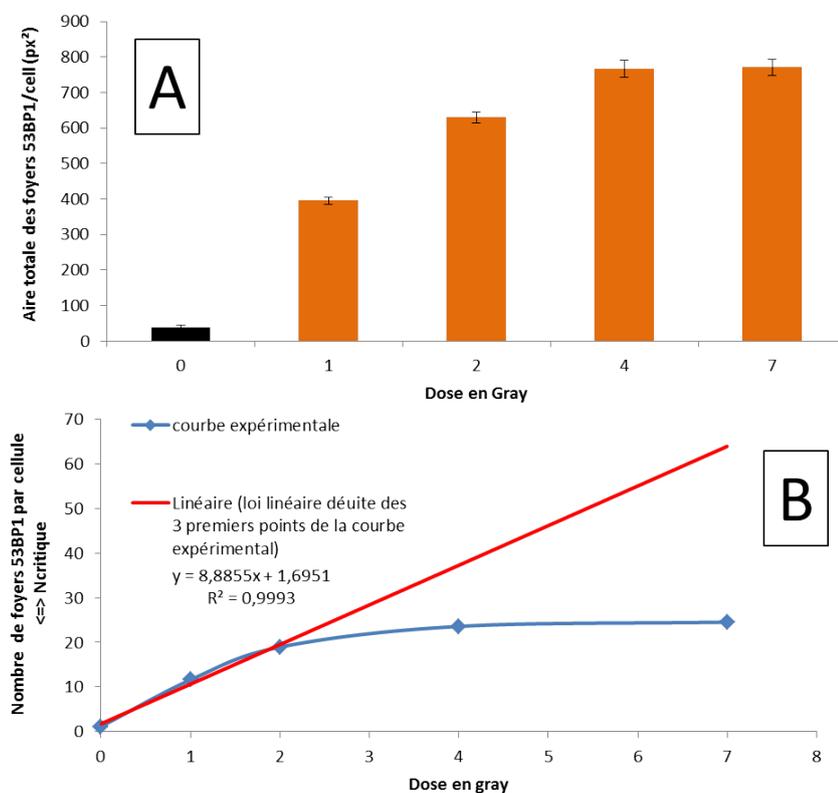


FIGURE 10.1 – *Evaluation de la saturation du système de réparation des cellules NHDFs-F1MC. Pour ce faire nous avons irradié des cellules NHDFs-F1MC à différentes doses : 1, 2, 4 et 7 Gy. Ensuite nous avons réalisé les immunofluorescences dirigées contre 53BP1.*

- *Panel A : Chaque barre représente la moyenne et l'écart-type de l'aire totale des foyers 53BP1.*
- *Panel B : Modèle linéaire du recrutement des protéines 53BP1 avec la dose versus résultats expérimentaux mettant en évidence une saturation du nombre de foyers 53BP1.*

bolique modifiée. Dans cette partie du travail deux hypothèses extrêmes ont été testées, à savoir l'hypothèse d'un effet "bystander local" et celle d'un effet "bystander global". Dans la version "locale" l'effet est possible seulement à courte portée (diffusion intercellulaire), alors que dans la version "globale" l'effet est possible aussi à longue portée (diffusion extracellulaire). Même si notre simulation été très simpliste et que beaucoup de paramètres n'ont pas été pris en compte, nous avons pu montrer une différence très notable entre la version "locale" et la version "globale". Ce résultat attendu, nous confirme le bon fonctionnement de l'algorithme et du module de diffusion intégré à celui-ci.

De manière intéressante ce modèle nous présente donc deux modalités différentes de survie cellulaire. D'un point de vue de la biologie et des fortes doses il est difficile de dire si l'une est plus pertinente que l'autre, néanmoins, nous pouvons réfléchir à cela en vu de l'expérience de biologie réalisée en irradiant des cellules NHDFs-F1MC avec des doses de 1, 2, 4 et 7 Gy. En effet en observant l'aire totale des foyers 53BP1 et la quantité de foyers 53BP1 en fonction de la dose nous observons une saturation, figure 10.1. Ce résultat est très intéressant puisqu'il peut suggérer que notre conclusion sur les résultats biophysiques est en accord avec l'expérience, à savoir si la capacité de réparation sature pour que la cellule survive il faut que la cellule adapte son nombre critique de CDB au delà duquel elle meurt. Autrement dit cela suggère un lien entre capacité de réparation et capacité de survie (dans le sens capacité à résister à une forte quantité de CDB), c'est à dire entre les deux modalités de survie cellulaire.

D'autres part, les cellules sénescents ne réparent pas les CDB et autres dommages impliquant la voie DDR (télomères raccourcis, fourches de réplication bloquées) et cela produit un arrêt irréversible dans le cycle. De plus les cellules sénescents sont résistantes à l'apoptose. (FUMAGALLI et al. 2014;FAGAGNA 2008) il est bien montré que les rayonnements ionisants peuvent induire de la sénescence dans les cellules tumorales, ce qui provoque un arrêt de la croissance de la tumeur et donc un effet thérapeutique bénéfique, mais ces cellules ne sont pas mortes et donc persistent dans l'organisme avec un génome endommagé ce qui les met à risque d'une évolution néoplasique secondaire (récurrence de la maladie). Dans le cas des cellules normales nous avons montré que les cellules peuvent devenir sénescents et donc elles peuvent être également à risque d'une

évolution néoplasique secondaire (sarcomes radio-induits). Ainsi on voit ici toute l'importance de mieux comprendre les mécanismes biophysiques à l'origine de la résistance ou de la mort des cellules ainsi que les mécanismes à l'origine du devenir cellulaire comme la transformation néoplasique. Le modèle que nous avons développé dans le cadre de cette thèse bien que pour le moment en stade de développement est déjà capable de nous informer sur des comportements biophysiques originaux.

Bibliographie

- ABRAHAM, R. T. (2002). « Checkpoint signalling : focusing on 53BP1 ». In : *Nature Cell Biology* 4.12, E277–E279. ISSN : 1465-7392. DOI : 10.1038/ncb1202-e277.
- AGUILERA, A. et Belén GÓMEZ-GONZÁLEZ (2008). « Genome instability : a mechanistic view of its causes and consequences ». In : *Nature Reviews Genetics* 9.3, p. 204–217. ISSN : 1471-0056. DOI : 10.1038/nrg2268.
- AMENDOLA, B. E. et al. (1989). « Radiation-associated sarcoma : a review of 23 patients with postradiation sarcoma over a 50-year period ». In : *American Journal of Clinical Oncology* 12.5, p. 411–415. ISSN : 0277-3732.
- ARLEN, M. et al. (1971). « Radiation-induced sarcoma of bone ». In : *Cancer* 28.5, p. 1087–1099. ISSN : 0008-543X.
- ATTIKUM, H. van et S. M. GASSER (2005). « The histone code at DNA breaks : a guide to repair ? ». In : *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 6.10, p. 757–765. ISSN : 1471-0072. DOI : 10.1038/nrm1737.
- AZZAM, E. I. et al. (1998). « Intercellular communication is involved in the bystander regulation of gene expression in human cells exposed to very low fluences of alpha particles ». In : *Radiation Research* 150.5, p. 497–504. ISSN : 0033-7587.
- BADEL (2009). « Contrôle dosimétrique des traitements de radiothérapie par simulation Monte Carlo de l'image de dose portale transmise ». Thèse de doct. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon.
- BARBARA, B. et Spiro IRA (1998). « Post-irradiation sarcoma : History, outcome and determinants of outcome ». In : *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*Physics* 42.1, p. 193. ISSN : 03603016. DOI : 10.1016/S0360-3016(98)80239-3.
- BARNEY, B. M. et al. (2011). « Image-guided radiotherapy (IGRT) for prostate cancer comparing kV imaging of fiducial markers with cone beam computed tomography (CBCT) ». In : *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 80.1, p. 301–305. ISSN : 1879-355X. DOI : 10.1016/j.ijrobp.2010.06.007.

- BASKAR, R. et al. (2012). « Cancer and radiation therapy : current advances and future directions ». In : *International Journal of Medical Sciences* 9.3, p. 193–199. ISSN : 1449-1907. DOI : 10.7150/ijms.3635.
- BEKKER-JENSEN, S. et N. MAILAND (2010). « Assembly and function of DNA double-strand break repair foci in mammalian cells ». In : *DNA repair* 9.12, p. 1219–1228. ISSN : 1568-7856. DOI : 10.1016/j.dnarep.2010.09.010.
- BEN-PORATH, I. et R. A. WEINBERG (2005). « The signals and pathways activating cellular senescence ». In : *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37.5, p. 961–976. ISSN : 1357-2725. DOI : 10.1016/j.biocel.2004.10.013.
- BERNARD, D. et al. (2004). « Involvement of Rel/nuclear factor-kappaB transcription factors in keratinocyte senescence ». In : *Cancer Research* 64.2, p. 472–481. ISSN : 0008-5472.
- BIENERT, G. P., Jan K. SCHJOERRING et Thomas P. JAHN (2006). « Membrane transport of hydrogen peroxide ». In : *Biochimica Et Biophysica Acta* 1758.8, p. 994–1003. ISSN : 0006-3002. DOI : 10.1016/j.bbamem.2006.02.015.
- BLACKBURN, E. H. (2001). « Switching and signaling at the telomere ». In : *Cell* 106.6, p. 661–673. ISSN : 0092-8674.
- BLÖCHER, D., M. EINSPENNER et J. ZAJACKOWSKI (1989). « CHEF electrophoresis, a sensitive technique for the determination of DNA double-strand breaks ». In : *International Journal of Radiation Biology* 56.4, p. 437–448. ISSN : 0955-3002.
- BOICE, J. D. et al. (1988). « Radiation dose and second cancer risk in patients treated for cancer of the cervix ». In : *Radiation Research* 116.1, p. 3–55. ISSN : 0033-7587.
- BOUDAÏFFA, B. et al. (2000). « Resonant formation of DNA strand breaks by low-energy (3 to 20 eV) electrons ». In : *Science (New York, N.Y.)* 287.5458, p. 1658–1660. ISSN : 0036-8075.
- BRADY, M. S., J. J. GAYNOR et M. F. BRENNAN (1992). « Radiation-associated sarcoma of bone and soft tissue ». In : *Archives of Surgery (Chicago, Ill. : 1960)* 127.12, p. 1379–1385. ISSN : 0004-0010.
- BRENNER, D. J. et al. (1998). « The linear-quadratic model and most other common radiobiological models result in similar predictions of time-dose relationships ». In : *Radiation Research* 150.1, p. 83–91. ISSN : 0033-7587.
- BURKART, W., T. JUNG et G. FRASCH (1999). « Damage pattern as a function of radiation quality and other factors ». In : *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie* 322.2, p. 89–101. ISSN : 0764-4469.
- CAHAN, W. G. et H. Q. WOODARD (1948). « Sarcoma arising in irradiated bone ; report of 11 cases ». In : *Cancer* 1.1, p. 3–29. ISSN : 0008-543X.
- CALDECOTT, K. W. (2007). « Mammalian single-strand break repair : Mechanisms and links with chromatin ». In : *DNA Repair. Repair of small base lesions*

- in DNA—from molecular biology to phenotype 6.4, p. 443–453. ISSN : 1568-7864. DOI : 10.1016/j.dnarep.2006.10.006.
- (2008). « Single-strand break repair and genetic disease ». In : *Nature Reviews Genetics* 9.8, p. 619–631. ISSN : 1471-0064. DOI : 10.1038/nrg2380.
- CALDECOTT, K. W. et al. (1996). « XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro ». In : *Nucleic Acids Research* 24.22, p. 4387–4394. ISSN : 0305-1048.
- CHAFFER, C. L. et Robert A. WEINBERG (2011). « A perspective on cancer cell metastasis ». In : *Science (New York, N.Y.)* 331.6024, p. 1559–1564. ISSN : 1095-9203. DOI : 10.1126/science.1203543.
- CHOFOR, N. et al. (2012). « Internal scatter, the unavoidable major component of the peripheral dose in photon-beam radiotherapy ». In : *Physics in Medicine and Biology* 57.6, p. 1733–1743. ISSN : 1361-6560. DOI : 10.1088/0031-9155/57/6/1733.
- COLLADO, M. et M. SERRANO (2010). « Senescence in tumours : evidence from mice and humans ». In : *Nature Reviews Cancer* 10.1, p. 51–57. ISSN : 1474-175X. DOI : 10.1038/nrc2772.
- COLLINS, A. R. (2004). « The comet assay for DNA damage and repair : principles, applications, and limitations ». In : *Molecular Biotechnology* 26.3, p. 249–261. ISSN : 1073-6085. DOI : 10.1385/MB:26:3:249.
- CRISTOFALO, V. J. et al. (2004). « Replicative senescence : a critical review ». In : *Mechanisms of Ageing and Development* 125.10, p. 827–848. ISSN : 00476374. DOI : 10.1016/j.mad.2004.07.010.
- DALE, R. G. (1985). « The application of the linear-quadratic dose-effect equation to fractionated and protracted radiotherapy ». In : *The British Journal of Radiology* 58.690, p. 515–528. ISSN : 0007-1285, 1748-880X. DOI : 10.1259/0007-1285-58-690-515.
- DEBACQ-CHAINIAUX, Florence et al. (2009). « Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo ». In : *Nature Protocols* 4.12, p. 1798–1806. ISSN : 1750-2799. DOI : 10.1038/nprot.2009.191.
- DENG, Y., Suzanne CHAN et Sandy CHANG (2008). « Telomere dysfunction and Tumor Suppression—the Senescence Connection ». In : *Nature reviews. Cancer* 8.6, p. 450–458. ISSN : 1474-175X. DOI : 10.1038/nrc2393.
- DIALLO, I. et al. (2009). « Frequency Distribution of Second Solid Cancer Locations in Relation to the Irradiated Volume Among 115 Patients Treated for Childhood Cancer ». In : *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*Physics* 74.3, p. 876–883. ISSN : 03603016. DOI : 10.1016/j.ijrobp.2009.01.040.

- DIKOMEY, E. et al. (1998). « Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines ». In : *International Journal of Radiation Biology* 73.3, p. 269–278. ISSN : 0955-3002.
- DIMRI, G. P. et al. (1995). « A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92.20, p. 9363–9367. ISSN : 0027-8424.
- DUMA, M. Nona et al. (2010). « Comparative analysis of an image-guided versus a non-image-guided setup approach in terms of delivered dose to the parotid glands in head-and-neck cancer IMRT ». In : *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 77.4, p. 1266–1273. ISSN : 1879-355X. DOI : 10.1016/j.ijrobp.2009.09.047.
- ERIKSSON, D. et T. STIGBRAND (2010). « Radiation-induced cell death mechanisms ». In : *Tumour Biology : The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 31.4, p. 363–372. ISSN : 1423-0380. DOI : 10.1007/s13277-010-0042-8.
- FAGAGNA, F. d'Adda di (2008). « Living on a break : cellular senescence as a DNA-damage response ». In : *Nature Reviews Cancer* 8.7, p. 512–522. ISSN : 1474-175X. DOI : 10.1038/nrc2440.
- FAGAGNA, F. d'Adda di et al. (2003). « A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence ». In : *Nature* 426.6963, p. 194–198. ISSN : 1476-4687. DOI : 10.1038/nature02118.
- FAN, J. et al. (2004). « XRCC1 co-localizes and physically interacts with PCNA ». In : *Nucleic Acids Research* 32.7, p. 2193–2201. ISSN : 1362-4962. DOI : 10.1093/nar/gkh556.
- FELSENFELD, G. et Mark GROUDINE (2003). « Controlling the double helix ». In : *Nature* 421.6921, p. 448–453. ISSN : 0028-0836. DOI : 10.1038/nature01411.
- FENG, F. Y. et al. (2007). « Intensity-modulated radiotherapy of head and neck cancer aiming to reduce dysphagia : early dose-effect relationships for the swallowing structures ». In : *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 68.5, p. 1289–1298. ISSN : 0360-3016. DOI : 10.1016/j.ijrobp.2007.02.049.
- FERLAY, J. et al. (2010). « Estimates of worldwide burden of cancer in 2008 : GLOBOCAN 2008 ». In : *International Journal of Cancer* 127.12, p. 2893–2917. ISSN : 1097-0215. DOI : 10.1002/ijc.25516.
- FRANKENBERG-SCHWAGER, M. (1989). « Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells in vitro by ionizing radiation ». In : *Radiotherapy and Oncology : Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 14.4, p. 307–320. ISSN : 0167-8140.

- FREEMAN, D. E. et C. R. KING (2011). « Stereotactic body radiotherapy for low-risk prostate cancer : five-year outcomes ». In : *Radiation Oncology* 6, p. 3. ISSN : 1748-717X. DOI : 10.1186/1748-717X-6-3.
- FUMAGALLI, Marzia et al. (2014). « Stable cellular senescence is associated with persistent DDR activation ». In : *PloS One* 9.10, e110969. ISSN : 1932-6203. DOI : 10.1371/journal.pone.0110969.
- GERASHCHENKO, B. I. et R. W. HOWELL (2005). « Bystander cell proliferation is modulated by the number of adjacent cells that were exposed to ionizing radiation ». In : *Cytometry Part A* 66A.1, p. 62–70. ISSN : 1552-4922, 1552-4930. DOI : 10.1002/cyto.a.20150.
- GOODHEAD, D. T. (1994). « Initial events in the cellular effects of ionizing radiations : clustered damage in DNA ». In : *International Journal of Radiation Biology* 65.1, p. 7–17. ISSN : 0955-3002.
- HADJ-HAMOU, N. et al. (2011). « A transcriptome signature distinguished sporadic from postradiotherapy radiation-induced sarcomas ». In : *Carcinogenesis* 32.6, p. 929–934. ISSN : 1460-2180. DOI : 10.1093/carcin/bgr064.
- HALL, E. J. (1996). « Neutrons and carcinogenesis : a cautionary tale ». In : *Bulletin Du Cancer. Radiothérapie : Journal De La Société Française Du Cancer : Organe De La Société Française De Radiothérapie Oncologique* 83 Suppl, 43s–6s. ISSN : 0924-4212.
- HALL, E. J. et C. WUU (2003). « Radiation-induced second cancers : the impact of 3D-CRT and IMRT ». In : *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 56.1, p. 83–88. ISSN : 0360-3016.
- HANAHAN, D. et R. A. WEINBERG (2000). « The hallmarks of cancer ». In : *Cell* 100.1, p. 57–70. ISSN : 0092-8674.
- HANAHAN, D. et Robert A. WEINBERG (2011). « Hallmarks of Cancer : The Next Generation ». In : *Cell* 144.5, p. 646–674. ISSN : 00928674. DOI : 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- HAYFLICK, L. (1965). « The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains ». In : *Experimental Cell Research* 37.3, p. 614–636. ISSN : 0014-4827. DOI : 10.1016/0014-4827(65)90211-9.
- HELLEDAY, T. et al. (2007). « DNA double-strand break repair : From mechanistic understanding to cancer treatment ». In : *DNA Repair. Replication Fork Repair Processes* 6.7, p. 923–935. ISSN : 1568-7864. DOI : 10.1016/j.dnarep.2007.02.006.
- HENLE, E. S. et S. LINN (1997). « Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 272.31, p. 19095–19098. ISSN : 0021-9258.

- HOEIJMAKERS, J. H. (2001). « Genome maintenance mechanisms for preventing cancer ». In : *Nature* 411.6835, p. 366–374. ISSN : 0028-0836. DOI : 10.1038/35077232.
- ILIAKIS, G. (1991). « The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells ». In : *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 13.12, p. 641–648. ISSN : 0265-9247. DOI : 10.1002/bies.950131204.
- JACOBSEN, G. K. et al. (1993). « Increased incidence of sarcoma in patients treated for testicular seminoma ». In : *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)* 29A.5, p. 664–668. ISSN : 0959-8049.
- JAFFRAY, D. A. et al. (2002). « Flat-panel cone-beam computed tomography for image-guided radiation therapy ». In : *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 53.5, p. 1337–1349. ISSN : 0360-3016.
- JEMAL, A. et al. (2011). « Global cancer statistics ». In : *CA : a cancer journal for clinicians* 61.2, p. 69–90. ISSN : 1542-4863. DOI : 10.3322/caac.20107.
- JOINER, M. et Albert van der KOGEL, éd. (2009). *Basic clinical radiobiology*. 4th ed. London : Hodder Arnold. 375 p. ISBN : 978-0-340-92966-7.
- KAO, G. D., W. G. MCKENNA et T. J. YEN (2001). « Detection of repair activity during the DNA damage-induced G2 delay in human cancer cells ». In : *Oncogene* 20.27, p. 3486–3496. ISSN : 0950-9232. DOI : 10.1038/sj.onc.1204445.
- KARLSSON, P., E. HOLMBERG, K. A. JOHANSSON et al. (1996). « Soft tissue sarcoma after treatment for breast cancer ». In : *Radiotherapy and Oncology : Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 38.1, p. 25–31. ISSN : 0167-8140.
- KARLSSON, P., E. HOLMBERG, A. SAMUELSSON et al. (1998). « Soft tissue sarcoma after treatment for breast cancer—a Swedish population-based study ». In : *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)* 34.13, p. 2068–2075. ISSN : 0959-8049.
- KASTAN, M. B. et J. BARTEK (2004). « Cell-cycle checkpoints and cancer ». In : *Nature* 432.7015, p. 316–323. ISSN : 1476-4687. DOI : 10.1038/nature03097.
- KAWATA, T. et al. (2004). « G2 chromatid damage and repair kinetics in normal human fibroblast cells exposed to low- or high-LET radiation ». In : *Cytogenetic and Genome Research* 104.1, p. 211–215. ISSN : 1424-859X. DOI : 10.1159/000077491.
- KEINJ, R. (2011). « Modélisation de la croissance d'une tumeur après traitement par radiothérapie ». Thèse de doct. Université Henri Poincaré-Nancy I.
- EL-KHAMISY, S. F. et al. (2003). « A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage ». In : *Nucleic Acids Research* 31.19, p. 5526–5533. ISSN : 1362-4962.

- KIM, J. H. et al. (1978). « Radiation-induced soft-tissue and bone sarcoma ». In : *Radiology* 129.2, p. 501–508. ISSN : 0033-8419. DOI : 10.1148/129.2.501.
- KIM, J. et al. (2005). « Independent and sequential recruitment of NHEJ and HR factors to DNA damage sites in mammalian cells ». In : *The Journal of Cell Biology* 170.3, p. 341–347. ISSN : 0021-9525. DOI : 10.1083/jcb.200411083.
- KLAUNIG, J. E. et Lisa M. KAMENDULIS (2004). « The role of oxidative stress in carcinogenesis ». In : *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 44, p. 239–267. ISSN : 0362-1642. DOI : 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121851.
- KLIONSKY, D. J. et al. (2008). « Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes ». In : *Autophagy* 4.2, p. 151–175. ISSN : 1554-8635.
- KRY, S. F. et al. (2005). « The calculated risk of fatal secondary malignancies from intensity-modulated radiation therapy ». In : *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 62.4, p. 1195–1203. ISSN : 0360-3016. DOI : 10.1016/j.ijrobp.2005.03.053.
- KUTEN, A. et al. (1985). « Postirradiation soft tissue sarcoma occurring in breast cancer patients : report of seven cases and results of combination chemotherapy ». In : *Journal of Surgical Oncology* 28.3, p. 168–171. ISSN : 0022-4790.
- KUZMINOV, A. (2001). « DNA replication meets genetic exchange : chromosomal damage and its repair by homologous recombination ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98.15, p. 8461–8468. ISSN : 0027-8424. DOI : 10.1073/pnas.151260698.
- LAGRANGE, J. L. et al. (2000). « Sarcoma after radiation therapy : retrospective multiinstitutional study of 80 histologically confirmed cases. Radiation Therapist and Pathologist Groups of the Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer ». In : *Radiology* 216.1, p. 197–205. ISSN : 0033-8419. DOI : 10.1148/radiology.216.1.r00j102197.
- LAHAT, G., Alexander LAZAR et Dina LEV (2008). « Sarcoma epidemiology and etiology : potential environmental and genetic factors ». In : *The Surgical Clinics of North America* 88.3, p. 451–481, v. ISSN : 0039-6109. DOI : 10.1016/j.suc.2008.03.006.
- LAMARCHE, B. J., Nicole I. ORAZIO et Matthew D. WEITZMAN (2010). « The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance ». In : *FEBS letters* 584.17, p. 3682–3695. ISSN : 1873-3468. DOI : 10.1016/j.febslet.2010.07.029.
- LANGEN, K. M. et D. T. JONES (2001). « Organ motion and its management ». In : *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 50.1, p. 265–278. ISSN : 0360-3016.

- LASKIN, W. B., T. A. SILVERMAN et F. M. ENZINGER (1988). « Postradiation soft tissue sarcomas. An analysis of 53 cases ». In : *Cancer* 62.11, p. 2330–2340. ISSN : 0008-543X.
- LEE, A. C. et al. (1999). « Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 274.12, p. 7936–7940. ISSN : 0021-9258.
- LEE, B. Y. et al. (2006). « Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase ». In : *Aging Cell* 5.2, p. 187–195. ISSN : 1474-9718. DOI : 10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x.
- LEWIS, R. D. et al. (1999). « An MCNP-based model of a linear accelerator x-ray beam ». In : *Physics in Medicine and Biology* 44.5, p. 1219–1230. ISSN : 0031-9155.
- LO, S. S., Achilles J. FAKIRIS et al. (2010). « Stereotactic body radiation therapy : a novel treatment modality ». In : *Nature Reviews. Clinical Oncology* 7.1, p. 44–54. ISSN : 1759-4782. DOI : 10.1038/nrc1inonc.2009.188.
- LO, S. S., Susan D. MOFFATT-BRUCE et al. (2011). « The role of local therapy in the management of lung and liver oligometastases ». In : *Nature Reviews. Clinical Oncology* 8.7, p. 405–416. ISSN : 1759-4782. DOI : 10.1038/nrc1inonc.2011.75.
- LOMBARD, David B. et al. (2005). « DNA repair, genome stability, and aging ». In : *Cell* 120.4, p. 497–512. ISSN : 0092-8674. DOI : 10.1016/j.cell.2005.01.028.
- MA, N.-Y. et al. (2013). « Influence of chronic hypoxia and radiation quality on cell survival ». In : *Journal of Radiation Research* 54 (suppl 1), p. i13–i22. ISSN : 0449-3060, 1349-9157. DOI : 10.1093/jrr/rrs135.
- MACDOUGALL, R. Hugh, Gillian R. KERR et William DUNCAN (2006). « Incidence of sarcoma in patients treated with fast neutrons ». In : *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 66.3, p. 842–844. ISSN : 0360-3016. DOI : 10.1016/j.ijrobp.2006.05.062.
- MARK, R. J., J. W. BAILET et al. (1993). « Postirradiation sarcoma of the head and neck ». In : *Cancer* 72.3, p. 887–893. ISSN : 0008-543X.
- MARK, R. J., J. POEN et al. (1994). « Postirradiation sarcomas. A single-institution study and review of the literature ». In : *Cancer* 73.10, p. 2653–2662. ISSN : 0008-543X.
- M'KACHER, R. et al. (2015). « Detection and Automated Scoring of Dicentric Chromosomes in Nonstimulated Lymphocyte Prematurely Condensed Chromosomes After Telomere and Centromere Staining ». In : *International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics* 91.3, p. 640–649. ISSN : 03603016. DOI : 10.1016/j.ijrobp.2014.10.048.

- MURCIA, G. de et J. MÉNISSIER DE MURCIA (1994). « Poly(ADP-ribose) polymerase : a molecular nick-sensor ». In : *Trends in Biochemical Sciences* 19.4, p. 172–176. ISSN : 0968-0004.
- MURRAY, E. M. et al. (1999). « Postradiation sarcomas : 20 cases and a literature review ». In : *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 45.4, p. 951–961. ISSN : 0360-3016.
- NASSOUR, J. et al. (2016). « Defective DNA single-strand break repair is responsible for senescence and neoplastic escape of epithelial cells ». In : *Nature Communications* 7, p. 10399. ISSN : 2041-1723. DOI : 10.1038/ncomms10399.
- NG, J. et I. SHURYAK (2014). « Minimizing second cancer risk following radiotherapy : current perspectives ». In : *Cancer Management and Research* 7, p. 1–11. ISSN : 1179-1322. DOI : 10.2147/CMAR.S47220.
- OLIVE, P. L. (1992). « DNA organization affects cellular radiosensitivity and detection of initial DNA strand breaks ». In : *International Journal of Radiation Biology* 62.4, p. 389–396. ISSN : 0955-3002.
- PENEL, N. et al. (2008). « Frequency of certain established risk factors in soft tissue sarcomas in adults : a prospective descriptive study of 658 cases ». In : *Sarcoma* 2008, p. 459386. ISSN : 1357-714X. DOI : 10.1155/2008/459386.
- PITCHER, M. E. et al. (1994). « Post irradiation sarcoma of soft tissue and bone ». In : *European Journal of Surgical Oncology : The Journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 20.1, p. 53–56. ISSN : 0748-7983.
- PODGORSK, E. B. et International Atomic Energy AGENCY (2005). *Radiation Oncology Physics : A Handbook for Teachers and Students*. Vienna : International Atomic Energy Agency. 657 p. ISBN : 978-92-0-107304-4.
- POLLACK, L. A. et al. (2009). « Introduction : charting the landscape of cancer survivors' health-related outcomes and care ». In : *Cancer* 115.18, p. 4265–4269. ISSN : 0008-543X. DOI : 10.1002/cncr.24579.
- RESSLER, S. et al. (2006). « p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin ». In : *Aging Cell* 5.5, p. 379–389. ISSN : 1474-9718. DOI : 10.1111/j.1474-9726.2006.00231.x.
- ROBINSON, E., A. I. NEUGUT et P. WYLIE (1988). « Clinical aspects of postirradiation sarcomas ». In : *Journal of the National Cancer Institute* 80.4, p. 233–240. ISSN : 0027-8874.
- ROESKE, J. C. et al. (2000). « Intensity-modulated whole pelvic radiation therapy in patients with gynecologic malignancies ». In : *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 48.5, p. 1613–1621. ISSN : 0360-3016.
- RUBEN, J. D. et al. (2008). « The Effect of Intensity-Modulated Radiotherapy on Radiation-Induced Second Malignancies ». In : *International Journal of*

- Radiation Oncology Biology Physics* 70.5, p. 1530–1536. ISSN : 0360-3016. DOI : 10.1016/j.ijrobp.2007.08.046.
- RUBINSZTEIN, David C. et al. (2007). « Potential therapeutic applications of autophagy ». In : *Nature Reviews Drug Discovery* 6.4, p. 304–312. ISSN : 1474-1776, 1474-1784. DOI : 10.1038/nrd2272.
- RUKA, W. et al. (1991). « Induced soft tissue sarcomas following radiation treatment for uterine carcinomas ». In : *European Journal of Surgical Oncology : The Journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 17.6, p. 585–593. ISSN : 0748-7983.
- SACHS, R. K. et al. (1990). « Incorporating Dose-Rate Effects in Markov Radiation Cell Survival Models ». In : *Radiation Research* 124.2, p. 216. ISSN : 00337587. DOI : 10.2307/3577869.
- SACHS, R.K., L.R. HLATKY et P. HAHNFELDT (2001). « Simple ODE models of tumor growth and anti-angiogenic or radiation treatment ». In : *Mathematical and Computer Modelling* 33.12, p. 1297–1305. ISSN : 08957177. DOI : 10.1016/S0895-7177(00)00316-2.
- SCHNARR, K. et al. (2009). « Radiation-induced lymphocyte apoptosis to predict radiation therapy late toxicity in prostate cancer patients ». In : *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 74.5, p. 1424–1430. ISSN : 1879-355X. DOI : 10.1016/j.ijrobp.2008.10.039.
- SCHRAUFSTATTER, I. U. et al. (1986). « Oxidant injury of cells. DNA strand-breaks activate polyadenosine diphosphate-ribose polymerase and lead to depletion of nicotinamide adenine dinucleotide ». In : *The Journal of Clinical Investigation* 77.4, p. 1312–1320. ISSN : 0021-9738. DOI : 10.1172/JCI112436.
- SO, S., Anthony J. DAVIS et David J. CHEN (2009). « Autophosphorylation at serine 1981 stabilizes ATM at DNA damage sites ». In : *The Journal of Cell Biology* 187.7, p. 977–990. ISSN : 1540-8140. DOI : 10.1083/jcb.200906064.
- SONNTAG, Clemens von (2006). *Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair : A Chemical Perspective*. Google-Books-ID : ivETYSxZmPcC. Springer Science & Business Media. 528 p. ISBN : 978-3-540-30592-7.
- SORENSEN, B. Singers et al. (2011). « Dependence of cell survival on instantaneous dose rate of a linear accelerator ». In : *Radiotherapy and Oncology* 101.1, p. 223–225. ISSN : 01678140. DOI : 10.1016/j.radonc.2011.06.018.
- SPYCHER, C. et al. (2008). « Constitutive phosphorylation of MDC1 physically links the MRE11-RAD50-NBS1 complex to damaged chromatin ». In : *The Journal of Cell Biology* 181.2, p. 227–240. ISSN : 1540-8140. DOI : 10.1083/jcb.200709008.
- STEWART, B. et WILD (2014). « World Cancer Report 2014 ». In :

- TAGHIAN, A. et al. (1991). « Long-term risk of sarcoma following radiation treatment for breast cancer ». In : *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 21.2, p. 361–367. ISSN : 0360-3016.
- TAVERNA PORRO, Marisa L. et Marc M. GREENBERG (2013). « DNA double strand cleavage via interstrand hydrogen atom abstraction ». In : *Journal of the American Chemical Society* 135.44, p. 16368–16371. ISSN : 1520-5126. DOI : 10.1021/ja409513q.
- TAYLOR, R. C., Sean P. CULLEN et Seamus J. MARTIN (2008). « Apoptosis : controlled demolition at the cellular level ». In : *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9.3, p. 231–241. ISSN : 1471-0080. DOI : 10.1038/nrm2312.
- « The Global Burden of Cancer 2013 » (2015). In : *JAMA oncology* 1.4, p. 505–527. ISSN : 2374-2437. DOI : 10.1001/jamaonco1.2015.0735.
- « The International Commission on Radiation Units and Measurements » (2010). In : *Journal of the ICRU* 10.1, NP–NP. ISSN : 1473-6691, 1742-3422. DOI : 10.1093/jicru/ndq001.
- TIPTON, K. et al. (2011). « Stereotactic body radiation therapy : scope of the literature ». In : *Annals of Internal Medicine* 154.11, p. 737–745. ISSN : 1539-3704. DOI : 10.7326/0003-4819-154-11-201106070-00343.
- TOMEZAK, M. et al. (2016). « A biophysical model of cell evolution after cytotoxic treatments : Damage, repair and cell response ». In : *Journal of Theoretical Biology* 389, p. 146–158. ISSN : 1095-8541. DOI : 10.1016/j.jtbi.2015.10.017.
- TOUSSAINT, O. et al. (2000). « Stress-induced premature senescence as alternative toxicological method for testing the long-term effects of molecules under development in the industry ». In : *Biogerontology* 1.2, p. 179–183. ISSN : 1389-5729, 1573-6768. DOI : 10.1023/A:1010035712199.
- TUBIANA, M. (2009). « Can we reduce the incidence of second primary malignancies occurring after radiotherapy? A critical review ». In : *Radiotherapy and Oncology : Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 91.1, p. 4–15, 4–15. ISSN : 0167-8140. DOI : 10.1016/j.radonc.2008.12.016.
- TUBIANA, M., J. DUTREIX et A. WAMBERSIE (1986). *Radiobiologie*. Paris : Hermann.
- TUCKER, M. A. et al. (1987). « Bone sarcomas linked to radiotherapy and chemotherapy in children ». In : *The New England Journal of Medicine* 317.10, p. 588–593. ISSN : 0028-4793. DOI : 10.1056/NEJM198709033171002.
- TUDEK, B. (2007). « Base excision repair modulation as a risk factor for human cancers ». In : *Molecular Aspects of Medicine* 28.3, p. 258–275. ISSN : 0098-2997. DOI : 10.1016/j.mam.2007.05.003.
- VAUTRAVERS, C. et al. (2010). « [Sarcomas in irradiated fields : Recent data] ». In : *Cancer Radiothérapie : Journal De La Société Française De Radiothérapie*

- Oncologique* 14.1, p. 74–80. ISSN : 1769-6658. DOI : 10.1016/j.canrad.2009.09.003.
- WANG-CHESEBRO, A. et al. (2006). « Intensity-modulated radiotherapy improves lymph node coverage and dose to critical structures compared with three-dimensional conformal radiation therapy in clinically localized prostate cancer ». In : *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 66.3, p. 654–662. ISSN : 0360-3016. DOI : 10.1016/j.ijrobp.2006.05.037.
- 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* 35, p. 95–125. ISSN : 0079-6603.
- (1995). « Radiation mutagenesis : the initial DNA lesions responsible ». In : *Radiation Research* 142.3, p. 362–368. ISSN : 0033-7587.
- WEI, L. et al. (2013). « Damage response of XRCC1 at sites of DNA single strand breaks is regulated by phosphorylation and ubiquitylation after degradation of poly(ADP-ribose) ». In : *Journal of Cell Science* 126 (Pt 19), p. 4414–4423. ISSN : 1477-9137. DOI : 10.1242/jcs.128272.
- WHITEHOUSE, C. J. et al. (2001). « XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair ». In : *Cell* 104.1, p. 107–117. ISSN : 0092-8674.
- WU, Q. J. et al. (2008). « The impact of respiratory motion and treatment technique on stereotactic body radiation therapy for liver cancer ». In : *Medical Physics* 35.4, p. 1440–1451. ISSN : 0094-2405. DOI : 10.1118/1.2839095.
- ZDANOV, S et al. (2007). « Normal or stress-induced fibroblast senescence involves COX-2 activity ». In : *Experimental Cell Research* 313.14, p. 3046–3056. ISSN : 00144827. DOI : 10.1016/j.yexcr.2007.04.033.
- ZHANG, J. et S. N. POWELL (2005). « The role of the BRCA1 tumor suppressor in DNA double-strand break repair ». In : *Molecular cancer research : MCR* 3.10, p. 531–539. ISSN : 1541-7786. DOI : 10.1158/1541-7786.MCR-05-0192.

Chapitre **1 1**

article publié dans le cadre de la thèse



A biophysical model of cell evolution after cytotoxic treatments: Damage, repair and cell response



M. Tomezak^{a,b}, C. Abbadie^{b,d}, E. Lartigau^c, F. Cleri^{a,d,*}

^a Institut d'Electronique Microelectronique et Nanotechnologie (IEMN), UMR Cnrs 8520, 59652 Villeneuve d'Ascq, France

^b CNRS, Institut Pasteur de Lille, UMR Cnrs 8161 Mechanisms of Tumorigenesis and Targeted Therapies, 59000 Lille, France

^c Centre de Lutte contre le Cancer "Oscar Lambret", 59000 Lille, France

^d Université de Lille I, Sciences et Technologies, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

HIGHLIGHTS

- Agent-based model of cell population damage by radio- and chemotherapy.
- Includes cell damage, repair, healthy and tumoral cells, chemical diffusion, cell motility, and more.
- Simulation of experimental cell survival curves and of bystander effect in radiotherapy.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 July 2015

Received in revised form

26 October 2015

Accepted 28 October 2015

Available online 6 November 2015

Keywords:

Cell population modelling

Agent-based modelling

Cancer radiotherapy

Cell survival curves

Bystander effect

ABSTRACT

We present a theoretical agent-based model of cell evolution under the action of cytotoxic treatments, such as radiotherapy or chemotherapy. The major features of cell cycle and proliferation, cell damage and repair, and chemical diffusion are included. Cell evolution is based on a discrete Markov chain, with cells stepping along a sequence of discrete internal states from 'normal' to 'inactive'. Probabilistic laws are introduced for each type of event a cell can undergo during its life: duplication, arrest, senescence, damage, reparation, or death. We adjust the model parameters on a series of cell irradiation experiments, carried out in a clinical LINAC, in which the damage and repair kinetics of single- and double-strand breaks are followed. Two showcase applications of the model are then presented. In the first one, we reconstruct the cell survival curves from a number of published low- and high-dose irradiation experiments. We reobtain a very good description of the data without assuming the well-known linear-quadratic model, but instead including a variable DSB repair probability. The repair capability of the model spontaneously saturates to an exponential decay at increasingly high doses. As a second test, we attempt to simulate the two extreme possibilities of the so-called 'bystander' effect in radiotherapy: the 'local' effect versus a 'global' effect, respectively activated by the short-range or long-range diffusion of some factor, presumably secreted by the irradiated cells. Even with an oversimplified simulation, we could demonstrate a sizeable difference in the proliferation rate of non-irradiated cells, the proliferation acceleration being much larger for the global than the local effect, for relatively small fractions of irradiated cells in the colony.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The development of cancer in a living organism follows complex paths, not without seemingly contradictory features. From the broad point of view of systems theory, the emergence of cancer cells may be seen as a stochastic process, in which a few cells, or

* Corresponding author at: Institut d'Electronique Microelectronique et Nanotechnologie (IEMN), UMR Cnrs 8520, 59652 Villeneuve d'Ascq, France.

E-mail address: fabrizio.cleri@univ-lille1.fr (F. Cleri).

even just one, change their nature without a traceable cause-effect mechanism, and start proliferating abnormally. On the other hand, the rapid and uncontrolled development of tumoral tissues is unlikely to be described as a purely stochastic phenomenon, and metastatic propagation is drastically distinct from a simple diffusion-like flow: these features rather have the character of self-organising, non-equilibrium dynamical systems, susceptible of taking on a chaotic or avalanche pattern under the effect of a small perturbation (see, e.g., Hart et al., 2015; Greaves, 2015).

Introducing such a language from theoretical physics in the domain of cancer may seem unusual. However, physical-

Table 1

List of the principal model variables. Unless differently indicated, all the variables are adimensional.

Symbol	Variable	Units	Role	Values
N	Lattice size		Linear size of the square lattice	—
i	Site index		Label of lattice site	$[1, N^2]$
N_c	Number of cells		Running size of the cell population	—
$u(i)$	Cell index		Label of cell u on a lattice site	$[1, N_c]$
Δ	Dose		Amount of energy supplied over a given time interval	$[0, \infty]$
\mathbf{n}	Cell state vector		vector containing all local cell parameters	—
t	Global time	Seconds	Universal 'laboratory' time of the simulation	$[-\infty, \infty]$
Δt	Time step	Seconds, minutes	Discrete simulation time increment	$[0.001-0.1]$
t_d	Cell time	Minutes	Time clock local to each cell	$[0, 1440]$
t_0	Duplication time	Minutes	Time since last duplication for each cell	$[0, \infty]$
τ	Duplication time constant	Minutes	See Eq. (1)	30
ϕ	Cell phase index		Defines the cell phase (G0,G1,S,G2,M)	$[0, 4]$
T	Cell type index		Epithelial, fibroblast, nerve, muscle, hematopoietic	$[1, 5]$
λ	Cell state index		Normal, senescent, quiescent, arrested, neoplastic, stem, dead	$[1, 7]$
ν	Damage type		Double- or single-strand breaks (DSB, SSB)	$[1, 2]$
z_ν	Damage counter		Counts accumulated number of defects of type ν	$[0, \infty]$
p_ν	Damage probability		Probability of generating a defect of type ν	$[0, 1]$
r_ν	Repair probability		Probability of healing a defect of type ν	$[0, 1]$
N_{crit}	Critical damage		Number of lethal damage (DSBs) above which a cell is considered dead	$[5, 100]$
D	Number of duplications		Number of duplications undergone by each cell	$[0, \infty]$
S	Senescence factor		Describe the senescence of each cell	$[1, 0]$
D_0	Number of duplications		Number of duplications at which senescence starts	30
D_s	Number of duplications		Number of duplications at which senescence is complete	60
P_n	Cell state probability		Probability that cell is in state \mathbf{n} at a given time	$[0, 1]$
P_{dupl}	Duplication probability		Controls probability of duplication for each cell	$[0, 1]$
P_{arr}	Arrest probability		Controls probability of arresting a cell for DSB accumulation or senescence	$[0, 1]$
P_{death}	Death probability		Controls probability of cell death when DSBs in a cell approach N_{crit}	$[0, 1]$
α	Retarding parameter		Slows cell killing by DSB accumulation	> 1
$P_{restart}$	Restart probability		Controls probability of restarting cell cycle from an arrested state	$[0, 1]$
β	Accelerating parameter		Accelerates cell repair capability to promote restarting	$[0.5-2.]$
$C_{u(i)}^{\mu}$	Chemical concentration		Instantaneous concentration of species μ in cell $u(i)$	$[0, \infty]$
$S_{u(i)}^{\mu}$	Source concentration		Constant source of species μ in cell $u(i)$	$[0, \infty]$
θ^μ	Diffusion time	Minutes	Inverse diffusion coefficient for species μ	$[0, \infty]$
c^B	B-factor concentration		Instantaneous concentration of 'bystander' pro-mitogenic factor	$[0, \infty]$
s^B	B-factor source		Constant source of 'bystander' pro-mitogenic factor	$[0, 1]$
D^B	B-factor diffusion coefficient		Reciprocal of θ^B , the diffusion time of the 'bystander' pro-mitogenic factor across the cell membrane	$[0, 1]$
γ	Coupling parameter		Couples concentration of B-factor to cell duplication time	$[0.1-2.]$

mathematical models have already accumulated a considerable tradition in cancer studies. Early analytical models based on coupled partial differential equations (see, e.g., Brunton and Wheldon, 1980; Sachs et al., 2001) have been accompanied in recent years, and often superseded by complex numerical simulations models (Edelman et al., 2010; Deisboeck et al., 2011; Lowengrub et al., 2010; Tracqui, 2009), which attempt at following the space- and time-dependent dynamics of cancer growth, by adding an increasing wealth of details and phenomenological correlations coming from biochemical and clinical studies.

Despite the considerable efforts in modelling, cancer treatments are still relying on a substantially empirical knowledge. Radiotherapy employs ionising radiation to eradicate cancer cells, mainly through the generation of DNA double-strand breaks (DSB), although the detailed mechanisms by which DSB and other sub-cellular lesions are generated are still quite far from clear. Empirical descriptions, such as the so-called linear-quadratic model (Dale, 1985) are still extensively used in radiotherapy, to describe cell damage upon the delivery of ionising radiation, together with extensions, such as the 'Tumor Control Probability' model (Kutcher, 1996), aimed at predicting the clinical efficacy of radiotherapeutic protocols. However, a detailed correlation between the radiation dose and its microscopic outcomes, both at the cell and tissue level, is still missing.

In this work we develop, implement, calibrate, and apply a discrete-cell model with internal degrees of freedom, capable of describing both normal and cancer cell evolution, and accounting for localised damage and repair mechanisms, with the aim of

studying the long-term evolution of a cell population subject to cytotoxic therapeutic treatments. Our main interest and application concerns the immediate and delayed action of radiotherapy treatments. However, the formalism developed here is enough general to be easily applicable to other cytotoxic agents, such as chemotherapy, oxidative poisoning, environmental (UV) radiation damage.

The virtual cell population is represented by a large assembly (up to several millions) of individual stochastic agents (see, e.g., Byrne and Drasdo, 2009; Wang et al., 2015; Cilfone et al., 2015), endowed with a number of probabilistic properties (phenotypes), which allow us to follow the evolution of individual cells through their daily cycle over very long time scales (days, months, up to years). Each cell has a local clock which goes through the G1, S, G2 and M phases, typically (but not necessarily) following a 24 h cycle. Cell duplication with inheritance is allowed, with individual probability laws depending on the cell state at any given time. Normal, stem, or tumor cells of various kinds can be included, though in this work only normal cells will be considered. In the simplest implementation, adapted to mimicking in vitro experiments on cell colonies, simulated cells live on a two-dimensional fixed square grid and can migrate by vicinal displacements. Diffusion of, e.g., oxygen, nutrients, or other chemical species is allowed on the same grid.

These model cells can absorb a number of different damaging events, described by a Markov chain which changes the state of each cell from healthy, to progressively damaged, to arrested and finally dead. In this first paper we model only radiation-induced

DNA damage in the form of single-strand and double-strand breaks. However, other DNA lesions, such as base excision, cross-linking, clustered defects, could be included by extending the model, as well as damage to other vital cell components, such as mitochondria. Repair mechanisms are included aside of the damage, by assigning to each cell a set of probabilities to move its individual state upwards in the Markov chain state. Cells can also exit to a quiescent, or a senescent state, which then follow special paths.

Such a model will have predictive capability, after being properly calibrated on the evolution patterns of real biological cell lines. It should be able to predict the long term evolution (ranging from week to months, up to 5–10 years time, well-beyond the time scales accessible to direct biological experimentation) of a population of cells with arbitrary characteristics. The model could follow the evolution of cells under time-detailed radiological or chemical treatments, which alter the cell viability, notably by modifying its health condition and repair capabilities. In the present work, in order to calibrate the probability of inducing a SSB or a DSB, we performed photon-beam irradiation experiments in a clinical LINAC, on cultures of normal human dermal fibroblasts. The DNA damage was quantitatively analysed by searching foci of XRCC1 and 53BP1, two proteins involved in the repair of SSBs and DSBs respectively, by means of immunofluorescence.

While biophysical models covering some of the above characteristics have been already introduced in the literature, based on various mathematical approaches (see, e.g., Sánchez-Reyes, 1992; Stewart, 2001; Kansal et al., 2000; Deisboeck et al., 2011; Wang et al., 2015, and references therein), our model aims at assembling the most relevant features, in the attempt to develop a realistic platform for the virtual modelling of the long-term evolution of cell proliferation and damage, following various types of therapeutic treatments. While some work in this direction has been initiated in the chemotherapy area (Silva and Gatenby, 2010; Gevertz et al., 2015; Chaplain and Powathil, 2015), it is worth noting that the coupling of agent-based models with radiotherapy, to simulate the action of external agents on cancer growth and/or arrest, is not yet fully developed. Even the most recent attempts in this direction (see, e.g., Kempf et al., 2013; Powathil et al., 2013) did not include an explicit simulation of the radiation damage, but rather assumed a pre-existing damage model (such as the linear-quadratic, etc.). An original contribution of the present simulation model is the introduction of explicit damage accumulation and repair, at the single-cell level.

After an ample Section 2 describing the key details of the model, in Section 3 we include two benchmark applications, aimed at demonstrating some key features of the computer model, namely: the reproduction of cell survival curves from irradiation experiments, and a simulation of the so-called ‘bystander’ effect. Note that, for the purpose of this first work, the two applications must be intended only as test cases, with no presumption of going in depth into the complex biophysical foundations, nor the medical implications of the corresponding phenomena.

2. Model

We use an agent-based model to describe the evolution of a cell population, under normal conditions, or in response to a physical or chemical perturbation. Each cell is represented as an ‘agent’, endowed with probabilistic rules to follow in the course of the simulation, both for their behaviour as independent units, and in interaction with each other. In our model, agents live on a fixed lattice (in the present study simply two-dimensional (2D) with fourfold symmetry), and can move on the lattice sites, carrying all the information about their state. A cell u at a site i will be indicated

as $u(i)$. The time-dependent behaviour of each cell is characterised by a number of descriptors, collected in a state vector $\mathbf{n}(t)$ (see below). Such an implementation is different from other lattice-based models, e.g., of Potts or lattice-gas type (for a review see Anderson, 2007), in that the properties are dynamically carried by the agents, and not statically attributed to the lattice sites. Such a setting should be more flexible in the numerical implementation, also in view of the future developments of the model.

Cells–agents may receive signals and input both from the environment and their neighbouring agents, as well as transmit signals to the environment and their neighbours. Agents make decisions based on both their inputs and internal state. In future developments, cells will also include layers of subcellular decision-making rules; however, here we will only consider a constant set of rules, valid for the ensemble of cells. An agent may change state, proliferate, or undergo apoptosis or necrosis in response to surrounding conditions. Cellular division requires space and a sufficient level of nutrients and oxygen. A cell may enter into a quiescent state, if the space is restricted (confluence), or if the nutrient supply is scarce. After cytotoxic treatments, a cells can arrest its life cycle and go into a quiescent or arrested state. From here, it can either die with a finite probability; or restart, either in the normal cycle or with a neoplastic character, as a function of the accumulated damage. Fig. 1 illustrates a block diagram of the cell phenotype decision process.

2.1. Normal cell cycle

Aside of the global simulation time, hereafter indicated by t , each cell has a local clock $t_d = t - t_0$, with t_0 being the time of its last duplication, running over a cycle of 24 h. The local time t_d spans the four typical phases of the cell cycle, namely: G1 from $t_d=0$ to 750 min; S from $t_d=751$ to 1250; G2 from $t_d=1251$ to 1370; M from $t_d=1371$ to 1440 min. (The timings are attributed conventionally.) Cells can be synchronised if needed, but the typical starting configuration is obtained with all cells randomly distributed among the four phases. Cell duplication should occur in the phase M, however a degree of randomness is allowed, by introducing a duplication probability:

$$P_{dupl} = \frac{\phi}{4} \left(\frac{1}{1 + e^{-(t_d - 1370)/\tau}} \right) \quad (1)$$

with the duplication time constant $\tau \simeq 30$ min, and $\phi = 1, 2, 3, 4$ for G1, S, G2, M, respectively. Fluctuations in the duplication time of typical fibroblast cells, as well as for several other cell types including bacteria, are often described by a ‘shifted-gamma’ probability distribution (see, e.g., Kutalik et al., 2005; Rubinow, 1968; Stukalin et al., 2013), whose corresponding integrated cumulative distribution function is very close to a Fermi function. We use the latter in Eq. (1) only because it is mathematically easier, however the numerical difference with the shifted-gamma is practically irrelevant. The dependence on the parameter ϕ is also rather irrelevant numerically, since in all cases the probability function (1) is practically equal to zero, until t_d is very close to 1370 min (begin of M phase), around which time P_{dupl} rapidly goes to 1.

The new (daughter) cell is spatially situated next to the old one, either in an empty lattice site, or by shifting nearby cells to empty sites in order to make room for the new one. When a cell duplicates, both its local clock and that of the daughter cell are reset to $t_0 = t$. It is possible for a cell to arrest duplication by entering in the G0 quiescent phase, for which $\phi = 0$.

Normal cells may also enter a ‘senescent’ state (distinct from G0) after a finite number of duplications. Among other phenotype changes, senescence modifies or suppresses the cell duplication capability, while conserving most of its metabolic activities

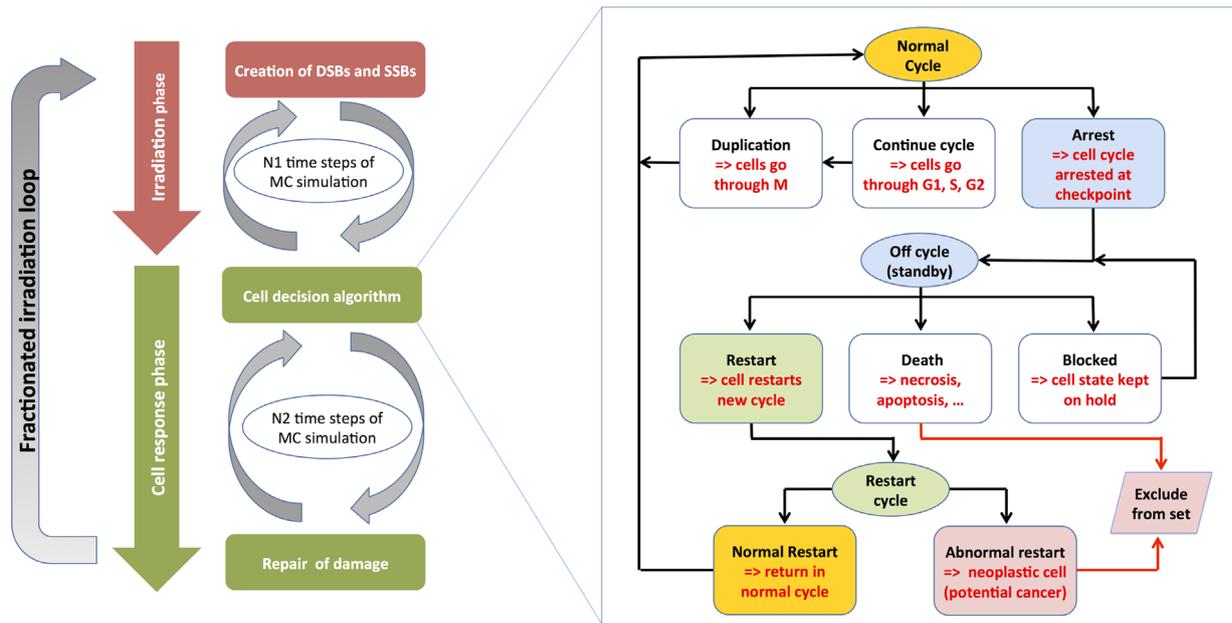


Fig. 1. Block diagram of the Monte Carlo (MC) simulation (left) and of the associated cell decision algorithm (right). Black lettering indicates the actions of the computer code; red lettering indicates the corresponding biological/phenotype outcomes; in white lettering, the explanatory notes. The irradiation phase (red) produces cell damage, with N_1 MC simulation steps. In the subsequent cell response stage (green), cells loop in the normal 24 h cycle, for N_2 MC simulation steps. The decision algorithm on the right describes how cells can repair damage, while following their doubling pattern. A cell arrest can occur because of excess damage or senescence, eventually followed by cell death; under given conditions, restart can occur that, in turn, can yield back either a normal cell, or evolve into a neoplastic cell. The coupled irradiation–evolution sequence (red–green) can be repeated cyclically (leftmost black arrow), to simulate a fractionated irradiation treatment. (For interpretation of the references to color in this figure caption, the reader is referred to the web version of this paper.)

(Hayflick, 1965; Cristofalo et al., 2004), Senescence can occur also prematurely in normal cells, subjected to other DNA damaging agents (Zdanova et al., 2007). This feature is taken into account by counting the number of duplications for each cell, D , and introducing the maximum duplication number D_s after which a cell enters into senescence, and the number D_0 at which the population starts having senescent cells. Then, the probability P_{dupl} is multiplied by a factor $S=1$ for $D \leq D_0$, $S=0$ for $D > D_s$, and:

$$S = 1 - \frac{D - D_0}{D_s - D_0} \quad (2)$$

for $D_0 < D \leq D_s$. The values of the constants D_0 and D_s are to be adjusted so as to reproduce typical senescence rates. Without loss of generality, in the following we will adopt $D_0=30$ and $D_s=60$, a value assessed for the case of human skin fibroblasts (Zdanova et al., 2007). The form of Eq. (2) suggests that any cells that proliferated the maximum number of times D_s are arrested, therefore the ‘senescent’ state may seem redundant with the G0. However, the G0 can be entered at any time (for example because cells attained confluence), and moreover the senescent state, notably in the case of keratinocytes, can be transient (Gosselin et al., 2009). Therefore, keeping this state allows cells to restart into a novel state even at (much) later times.

2.2. Diffusion

Chemical species μ with varying concentrations c^μ are allowed to diffuse on the lattice sites at each time step Δt , affecting all cells by various biological means. In each cell $u(i)$, instantaneously located on the lattice site i , chemicals are accounted according to deterministic gradient flow (Fick’s law):

$$c_{u(i)}^\mu = - \sum_j (c_{u(j)}^\mu - c_{u(i)}^\mu) \frac{\Delta t}{\theta^\mu} + s_{u(i)}^\mu \quad (3)$$

where the sum runs only on the sites j nearest neighbours of site i , according to the chosen lattice topology. Since the neighbours

realise in this first implementation a 2D diamond topology, the right-hand side of the previous equation is just a discretised representation of the Laplacian, multiplied by the time step, with the diffusion time-scale θ^μ playing the role (with appropriate dimensions) of a nominal diffusion coefficient.

A source s^μ can be located at one specific lattice site, or an ensemble of sites, and diffuse through the empty lattice until reaching the cells. Or, it can be contained in a cell (for example, a secreted factor), diffuse on the lattice, and move along with the displacement of the cell.

The cell membrane represents a semi-permeable barrier to almost all molecules and ions, with permeability coefficients much smaller than the diffusion in the surrounding fluid phase. Except special cases, therefore, diffusion on empty sites is considered instantaneous, while the membrane crossing of species μ is characterised by a diffusion time θ^μ depending on the cell state and local density.

It is worth noting that the local concentration of a species is contained in the cell $u(i)$ occupying the site i , and not on the site itself. Concentrations can build up from lattice-diffuse sources as well as from cells. For example, oxygen concentration at cell $u(i)$ is the result of the concentration field existing at site i , plus the eventual gradient coming from the neighbouring cells $u(j)$. In the special case of oxygen diffusion, the concentration at cells deep inside the colony can be considerably smaller than that of cells at the periphery, exposed to a much higher oxygen flux. Similar examples could be the highly variable metabolic rate of cancer cells as a function of their distance from blood vessels, or the complex chemistry of radiation-induced ‘bystander’ effect; this latter will make for an application example in the following Section 3.

2.3. Radiation damage

Ionising radiation tracks deposit their energy in the cell in a time of $\sim 10^{-13}$ s. This energy density, in the form of secondary radiation, produces a variable ionisation density on its way, over a

time of $\sim 10^{-9}$ s, and over a length which, depending on the primary radiation nature and energy, can range from a few μm to several cm. The correlation between radiation energy delivery and ionisation density is the linear energy transfer (LET). High-LET radiation, such as protons or alpha particles, have a high ionisation density along their path, however running along very straight tracks. Conversely, low-LET radiation, such as photons or low energy electrons, produce a much lower density of ionisation events per unit length, however their path is very diffuse and random, therefore their energy deposition is more homogeneous in the cell volume. Notably, only a relatively small fraction of the actual damage is produced by *direct* ionisation events, while the largest part is due to the secondary chemical species produced by the radiolysis of the molecules in the cytoplasm, i.e. mostly water, which thereby liberates free radicals OH^\bullet and H^\bullet , as well as free electrons (which go quickly into a solvated state). Such highly reactive species diffuse and attack the DNA (*indirect* damage), producing breaks in one (SSB) or both (DSB) the phosphate backbones, over a time scale of $\sim 10^{-6}$ – 10^{-3} s.

The ensemble of such events in our model is considered instantaneous, and gives rise to stochastic damage events in the population of cells, according to rules which will be detailed in the following. The minimum time scale we consider is of seconds, for the irradiation time, and minutes for the follow up. Irradiation can take place according to different protocols, however it is usually delivered in batches of several tens of seconds at most. It is known that cell repair enzymes start working at considerably longer times (see, e.g., Georgescu et al., 2015; Calini et al., 2002), therefore we will consider that no cell repair activity takes place during irradiation.

Radiation events are thought to follow a Poisson process (Kellerer, 1985), therefore it may be justified to describe the induced damage (both direct and indirect) as a Markov chain (Albright, 1989; Sachs et al., 1990). We assume that cells can be in any state $n \in [0, m]$, with $n=0$ corresponding to a healthy cell with zero accumulated damage, and $n=m$ to a cell with a maximum of accumulated damages. The n -th state of the cell is described by a set of indicators, or state vector, $\mathbf{n} = \{i, t_d, \phi, T, \lambda, z_\nu, p_\nu, r_\nu, c^\mu, \theta^\mu\}$, for the $\nu = 1, \dots, k$ different types of lesions (in the present case, it is only $\nu=1$ for DSBs and $\nu=2$ for SSBs); i is the lattice site occupied at time t ; ϕ is the cell phase; T is the cell type (epithelial, fibroblast, nerve, muscle, hematopoietic); λ is the cell state, an index 1, 2, 3, ... for normal, senescent, quiescent or G0, arrested, neoplastic, stem, or dead; z_ν is the number of accumulated damages of type ν ; p_ν is the corresponding damage probability; r_ν the repair probability; c^μ and θ^μ the concentration and diffusion time of species μ .

Let us define the probability $P_n(t)$ that a cell is found in the state n at time t , with $P_n \geq 0$ and $\sum_n P_n = 1$. The equation for a continuous-time Markov chain is:

$$\frac{dP_n(t)}{dt} = \sum_l W_{nl} P_l(t) + S_n \quad (4)$$

expressing the fact that the probability of observing the state n of the cell at time t is given by the sum over all possible probabilities of coming from any state $l \neq n$, multiplied by the transition matrix W_{nl} . S_n is a 'source' term, representing the probability that a cell is arriving in state n from a cell division at time t . The transition matrix sums up all the processes leading to cell state evolution:

$$W_{nl} = \sum_\nu (\Delta L_{nl}^\nu + R_{nl}^\nu) \quad (5)$$

where L_{nl}^ν represents the probability of making $l-n=d$ lesions of type ν , induced by a dose/unit time Δ (the dot indicating time derivative), and R_{nl}^ν the probability of repairing d lesions of type ν .

When considering that the number of radiation events per unit time in each cell nucleus is relatively small, the matrix elements of D can be assigned the form of a Poisson's distribution. By assuming an energy spectrum of the radiation $f(\epsilon)$, and by following the reasoning of Sachs et al. (2001), for each type of damage ν the probability of going from a state with n lesions to a state with $n+d$ lesions is written in matrix form as:

$$L_{n,n+d}^\nu = \begin{pmatrix} \mu_0 & 0 & 0 & \dots & 0 \\ \mu_1 & \mu_0 & 0 & \dots & 0 \\ \mu_2 & \mu_1 & \mu_0 & \dots & 0 \\ \dots & \dots & \dots & \dots & 0 \\ \mu_d & \mu_{d-1} & \mu_{d-2} & \dots & \mu_0 \end{pmatrix} \quad (6)$$

$$\mu_k = \int_0^\infty \frac{e^{-\epsilon} \epsilon^k}{k!} f(\epsilon) d\epsilon \quad (7)$$

For numerical efficiency, however, the energy spectrum is discretised, and for each energy interval the Poisson distribution is replaced by a limiting binomial (Keinj et al., 2011):

$$L_{n,n+d}^\nu = \lim_{m_0 \rightarrow \infty} \binom{m_0 - n}{d} p_\nu^d (1 - p_\nu)^{m_0 - n - d} \quad (8)$$

with $p_\nu = p_\nu(\epsilon)$ a piecewise, energy-dependent damage probability. By performing test simulations of irradiation at 2 Gy, we observe that already for $m_0 \approx 5$ m the binomial is practically superposed to a Poisson curve for all values of dose (see Fig. 2, showing the distributions of average DSB/cell as a function of the dose).

The choice of the repair probability matrix R depends on the details of the enzymatic processes leading to strand rejoining after SSB, DSB, etc. In this first paper, we take a simplistic approach by choosing a simple linear model, in which the repair fraction is dependent on the number of lesions still present, with a generic repair probability r , whose numerical value is different for each type of lesion:

$$R_{n,n-d}^\nu = -r_\nu d \quad (9)$$

which will result in an exponential repair probability distribution. Of course, there would be little difficulty in including more sophisticated models of repair kinetics (see, e.g., Cucinotta et al., 2008).

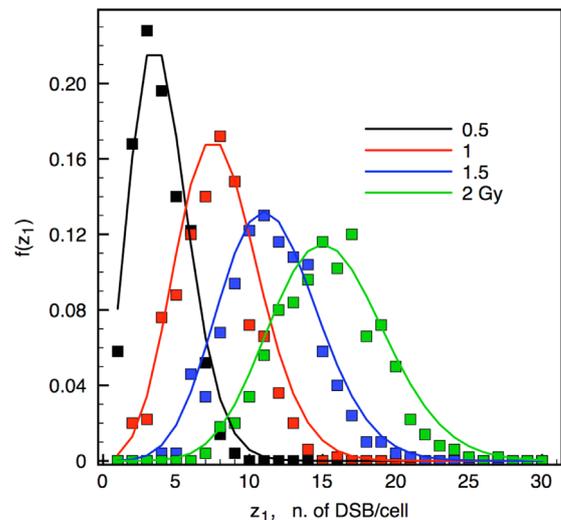


Fig. 2. Plot of the fraction of accumulated number of DSB lesions/cell, z_1 , at different average dose levels from 0.5 to 2 Gy. Total number of cells, $N_c=500$. Symbols represent the raw results of the Monte Carlo simulation; continuous curves represent the fit with a Poisson probability law.

The probabilities p_ν and r_ν can be made dependent on the state of the cell. The damage probability can change according to the different radiosensitivity of a cell, e.g., increase because of an increased oxygen concentration or decrease after a treatment. The current version of the model includes a possibility of decreasing p_ν by a simple sub-linear dependence on the total accumulated dose. However, the radiation resistance is affected by many different competing factors, notably a low oxygen level in the tumour mass (Graeber et al., 1996). Therefore, a more complete description of such metabolic reactions should be accounted for by means of appropriate parameters, controlled by a set of differential equations (see, e.g., Wang et al., 2015). The repair probability may be made variable as well, for example to account a slower recruitment of repair proteins in a heavily damaged cell nucleus. Note that, for the sake of simplicity, in the examples of the following Section 3 we will only use constant damage and repair probabilities.

In most experiments (see also Section 2.5 below) it is observed that similar cells, even belonging to the same line and culture, display variable radiosensitivity and repair capability (Dikomey et al., 1998). DSBs are mainly repaired by nonhomologous end-joining, thought to be the predominant pathway in all phases of the cell cycle; and by homologous recombination, in the late-S and G2 phases (see, e.g., Mao et al., 2008; Takashima et al., 2009). Repair capabilities are generally reduced in the late G2, and practically absent in the M phase because of the condensation of chromosomes. In this first version of the model, we attempt to roughly mimic this specific dependence of the repair capability on the cell phase, by setting:

$$r_1 = \begin{cases} \phi r & \text{if } \phi \leq 2 \\ \frac{2}{3} r & \text{if } \phi > 2 \end{cases} \quad (10)$$

for DSB repair kinetics (for simplicity we take $r_2 = \text{const}$ for SSBs, since they will not be relevant in the following simulation examples). It is worth noting that for cancer cells of various types the situation is even more complex than for normal cells; for example, a prevalence of radiosensitivity on the initial number of DSBs is more often observed, next to a reduced or even null dependence on the repair capability (El-Awady et al., 2003).

2.4. Monte Carlo simulation

The simulation space is defined by a 2D square lattice of $N \times N$ sites, uniquely labelled by a positive integer $i \leq N^2$. In the present work we adopt a minimal (also called ‘Von Neumann’) neighbourhood relationship, namely each site i interacts with the four neighbours (empty or occupied) located immediately above, below, left and right, in the 2D square topology.

An initial number of cells N_c , typically quite smaller than the ensemble of lattice sites, is dispersed on the lattice, either at random, or in one or more compact colonies. Cells can move on the lattice by discrete jumps to neighbouring sites. It is already known from previous studies that the underlying lattice topology may induce unrealistic features in the tissue morphology. However, in the present work cell displacements are either not considered at all, or allowed only in order to attain confluence; therefore this will not be a crucial limitation. On the other hand, if one is interested in simulating tissue and tumour morphogenesis, a denser lattice topology or a Voronoi tessellation may be adopted (Moreira and Deutsch, 2002), and eventually a 3D extension of the model becomes necessary. In the examples to follow, we will only use either normal cells receiving a homogeneous dose of radiation, or a mixture of irradiated versus non-irradiated cells; two types of defects (DSB and SSB) will be tracked, although the cell death probability will be depending only on the number of accumulated

DSBs. Such properties of the cell population can be easily modified, according to the subject of study.

Solving analytically the Kolmogorov, forward-type equation (4) for a fully coupled set of space- and time-dependent probabilities is practically impossible. We therefore make recourse to a Monte Carlo stochastic method of solution (see Fig. 1). At each discrete increment by Δt of the global time t , all the cells are scanned, and their state vector \mathbf{n} is updated. Probabilities for the various events a cell may undergo are sampled according to a rejection technique, i.e. a random number $\xi \in (0, 1)$ is drawn from a flat probability distribution, and compared to the event probability P . The event is accepted if $\xi < P$, otherwise it is rejected. For numerical efficiency, all such events are described in the following by continuous probability functions, however it may be noted that the functional shape practically corresponds to binary, ‘yes/no’ options, at each Monte Carlo sampling step.

For example, let us focus on a particular cell $i \in N_c$: as long as the time t increases, its local clock t_d advances, and its duplication probability P_{dupl} increases from nearly 0 in the G1 phase, to nearly 1 in the M phase. Correspondingly, at each time step t , the new $0 < \xi < 1$ will stochastically sample the increasing probability P_{dupl} , by producing a duplication event at a random time t_0 distributed according to P_{dupl} . The same random sampling happens for the probability of going from z_ν to $z_\nu + d$ lesions (with $\nu=1$ for DSBs and $\nu=2$ for SSBs, and damage probability p_ν if $d > 0$, or repair probability r_ν if $d < 0$); for the probability of going into, or escaping from, the quiescent state G0; and so on.

In a typical simulation of an irradiation session, cells are irradiated for some time of the order of 10 s to 100 s of seconds, with a time-step $\Delta t = 1$ s. Then, the evolution of the partly damaged population is followed for a time of the order of several hours, with a typical $\Delta t = 60$ s or larger. Eventually, the irradiation-evolution cycle may be repeated, to simulate fractionated radiotherapy. For the sake of simplicity, we assume that no cell evolution takes place during the short irradiation time, however this limitation can be easily removed.

As a result of radiation induced damage, cells can arrest the normal duplication cycle in any of the four phases, because some cycle checkpoint is not completed. We construct for this event a probability:

$$P_{arr} = \begin{cases} 1 & \text{if } z_1 > 0 \\ 1 - S & \text{if } z_1 = 0 \end{cases} \quad (11)$$

meaning that any cell having undergone DSB damage, or any cell entering senescence ($S > 0$, see Eq. (2)) can be arrested.

Once in this arrested condition, a cell can take at each time step one of three alternatives (Fig. 1). Firstly, it can die and be eliminated by apoptosis; for example, it is known that the p53 protein, a regulatory transcription factor, can trigger the expression of genes inducing apoptosis, when excessive DNA damage accumulates (Roos and Kaina, 2006). For all types of cell death, we introduce a probability:

$$P_{death} = \min \left[1, \left(\frac{z_1}{N_{crit}} \right)^\alpha \right] \quad (12)$$

with $\alpha > 1$ a slowing parameter, and N_{crit} a critical threshold of accumulated DSBs leading to cell death (‘mortality’ parameter). The value of the threshold depends on the cell type and on the irradiation conditions, typical values being in the range $N_{crit} \sim 5 \div 50$.

Alternatively the cell can resume its cycle, with probability:

$$P_{restart} = e^{-\beta z_1} \quad (13)$$

increasing at a rate $1/\beta \sim 0.5$ to 2, expressing the efficiency of the repair action, and getting equal to 1 when z_1 is back to 0. Or,

finally, the cell can remain in the quiescent state with probability $(1 - P_{\text{death}} - P_{\text{restart}})$ until the next time step. A list of the main variables and parameters of the model is provided in Table 1.

2.5. Calibration by irradiation experiments on human fibroblasts

Normal human dermal fibroblasts (NHDFs) used in this study were PromoCell F-1MC from a 1-year-old Caucasian male. Cells were cultured in incubator at 5% CO₂ and 37 °C, in basal medium (FBM - Fibroblast cell Basal Medium, Lonza) with 2% FBS (Foetal Bovine Serum), plus human fibroblast growth factor (hFGF), insulin at 5 mg/ml, and antibiotics Gentamicin 50 µg/ml and Amphotericin B 50 µg/ml. Cells were plated at 200,000 cells per 100-mm Petri dish, and cultures were always split at 70% confluence with the Reagent Pack™ by Clonetics (Hepes buffered saline solution, Trypsine/EDTA 25 mg and 10 mg per 100 ml, TNS Trypsin Neutralizing Solution). Population doubling was calculated at each passage, after cell counting with a Thoma or Malassez counting chamber. The number of population doublings, PD , was calculated as:

$$PD = \frac{\ln(N_{\text{coll}}/N_{\text{plat}})}{\ln 2} \quad (14)$$

N_{coll} , N_{plat} being the number of collected and plated cells, respectively.

Irradiations took place at the Varian Primus CLINAC of the ‘Oscar Lambret’ centre. Cells were cultured in a 96-well plate, deposited on 4 cm of a plastic plate (equivalent tissue) to ensure electronic equilibrium. (Note that for a 20 MV accelerating tension, the photon spectrum is peaked at a much lower energy of about 3 MeV, with an average energy of about 10 MeV.) The photon beam was directed from below the table, with intensity adjusted to provide 200 monitor units at the isocentre of the cell layer.

After the irradiation, cells were fixed with formalin, and permeabilised with triton 1% in PBS (Phosphate salt buffer: 3.2 mM Na₂HPO₄, 0.5 mM KH₂PO₄, 1.3 mM KCl, 135 mM NaCl, at pH=7.4). After washing, non-specific sites were blocked for 1 h in 5% skim milk diluted in PBS. Cells were then incubated in a solution of primary antibodies diluted at 1/100 or 1/200 (respectively for anti-53BP1 and anti-XRCC1) in the buffer (anti-53BP1 from Santa Cruz Biotechnology, SC-22760 and anti-XRCC1 from Santa Cruz Biotechnology, SC-11429). After several washes in PBS, the 96-well plates were incubated in a solution of secondary antibodies A21206 anti-IG (rabbit) from Life Technologies, diluted at 1/500 and coupled to a fluorochrome (ALEXA FLUOR 488). Subsequently, cell nuclei were coloured by a solution of Hoechst 33342 (Sigma) 5 mg/l in PBS. 96-well plate were finally analysed by HCS Operetta (Perkin Elmer). Counting of XRCC1 and 53BP1 foci was carried out with an image analysis software (Columbus by Zeiss).

3. Test cases in modelling cell culture irradiation

In this section we present two applications of our model, exploring only some of the wide range of possible simulations of cell evolution that it enables. We stress once more that such test cases are not meant to explore the complexity of the corresponding biophysical problems, but they only serve as the first, necessary test phase of the model.

To begin with, we need to firstly adjust the model kinetics on our experimental results of NHDF cell irradiation. Fig. 3 shows with square symbols the results of the counting of DSBs (blue) and SSBs (red) after a nominal 2 Gy irradiation. Note that the experimental control value (indicated by crosses at $t=0$) is practically 0 for DSBs, while it is around 10 SSB/cell; such a background corresponds to daily generation of damage from sources other

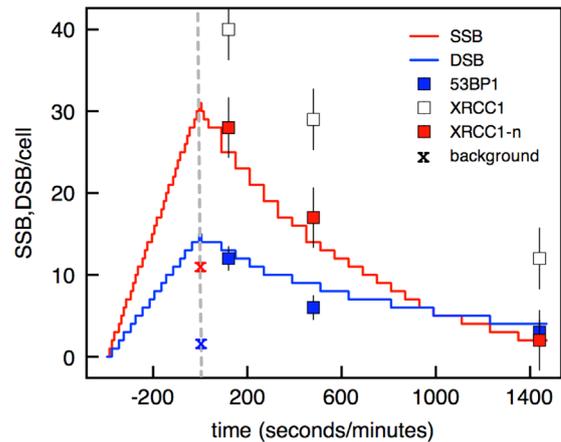


Fig. 3. Kinetics of the experimentally observed 53BP1 and XRCC1 foci after 2 Gy irradiation (symbols), with repair probabilities from Eq. (10) (histograms) adjusted to match the experimental kinetics. Crosses: background signal in absence of radiation (red=SSB, blue=DSB). White squares: XRCC1 raw data; red: XRCC1-n after subtracting the background at $t=0$; blue: 53BP1 data. Note the larger error bars for SSBs, pointing to a larger dispersion of the cell population for this type of lesions. The blue and red histograms correspond to the simulated model kinetics, with damage probabilities $\{p_1, p_2\}$, and repair probabilities $\{r_1, r_2\}$ adjusted to reproduce experimental irradiation data. The x -axis gives the time t in seconds, for $t < 0$, and in minutes, for $t > 0$. (For interpretation of the references to color in this figure caption, the reader is referred to the web version of this paper.)

than the irradiation. After subtracting the background, it is seen that over the 24 h about 25% of the DSBs are still unrepaired (blue squares), while practically all the SSB have been repaired (red squares; white squares, before subtraction of control). However, it is worth noting that for SSB there remains a disparity between cells, as shown by the larger standard deviation in the histogram, some cells still showing ~ 25 XRCC1 foci after 24 h. The average value of about 6 DSB/Gy observed here is quite smaller than the accepted values, in the range of 15–35 DSB/Gy (Lobrich et al., 1993; Schultz et al., 2000; El-Awady et al., 2003). The source of such a discrepancy is not yet clear, it might be related to the particular kind of signalisation protein chosen for damage identification.

For the computer simulation we will use a small test sample, made of $N_c=500$ cells distributed on a square lattice, and subject to a homogeneously distributed radiation dose. From our preliminary tests, such a size of population is already sufficient to obtain a good statistics on the system response. We use a time step of $\Delta t = 1$ min, for the 24 h in which the population is followed. In the same Fig. 3 we show two calculated histograms for creation ($t < 0$) and reparation ($t > 0$) of DSB (blue) and SSB (red). We calibrated the probabilities p_1 and p_2 of generating a DSB or a SSB, respectively, as well as the corresponding repair probabilities r_1 and r_2 , by using the experimental data as a reference. For the sake of simplicity, we assume the dose of 2 Gy, at a rate of 3 Gy/min (lower range of a typical LINAC machine), to be delivered by a monochromatic spectrum of gamma-rays at 20 MV. (Note that the x -axis in the figure give the time in seconds, for $t < 0$, and in minutes for $t > 0$). The best reproduction of the experimental data is obtained with $p_1 = 3.0 \times 10^{-4}$, $p_2 = 6.5 \times 10^{-4}$, $r_1 = 1.5 \times 10^{-3}$, $r_2 = 2.5 \times 10^{-3}$. The resulting histograms show a nearly exponential decay (as expected from (Eq. (9)), with the respective $t=0$ values giving the p_ν , and the decay constants giving the r_ν . Also, note that since we have 3+3 experimental data points, there is no over fitting of the four parameters.

Fig. 4 shows the effect of using a repair probability that depends on the cell phase. The open squares for the ‘mix’ case, in which the repair probability follows Eq. (10), correspond to the best fit already given in the previous Fig. 3. For the other cases, it can be seen that by restricting the repair to S-phase only a slower

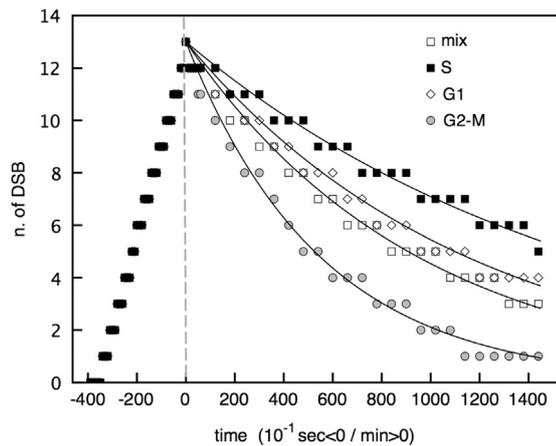


Fig. 4. Effect of including a cell-phase-dependent repair probability (see Eq. (10)). 'Mix' is the average, with repair functioning in all cell phases, 'S', 'G1', 'G2-M' refer to a repair probability restricted only to the corresponding cell phase. Continuous lines represent exponential fits to each set of symbols.

recovery of damage is obtained, while, at the other extreme, the faster recovery would correspond to concentrating the repair only in the G2 phase. In the remainder of this work, we will use the 'mix' option corresponding to the best fit.

After calibrating in this way the kinetics of our model, we will present a first example in which we apply the model to reproduce the well-known results of typical cell survival curves, following irradiation with increasing levels of dose. Then, in a second example we will test the ability of the model to incorporate spatial information, by developing a set of simulations of the so-called 'bystander' effect, namely the alteration in the response of non-irradiated cells when some nearby cells are irradiated.

3.1. Survival curves for irradiated cells

The 'linear-quadratic' (LQ) model is the most widely accepted mechanistic model of cell killing by radiation (see, e.g., Dale, 1985). While being a strictly phenomenological representation of experimental data about cell survival as a function of the total dose, the LQ is often justified by the concept of binary DSB mis-repair: since it is believed that the main chromosome aberrations ('dicentric') should likely occur after the wrong rejoining of a pair of close-by DSBs (Wlodek and Hittelman, 1988), it may occur that prolonged exposure to radiation would allow only one of the DSB to be repaired, before the second is generated. Although this is the most usual way to provide a motivation to the standard LQ approach, alternative biological explanations have also been advanced, such as the repair-misrepair (Tobias, 1985), the lethal-potentially lethal (Curtis, 1986), or the two-lesion kinetic model (Stewart, 2001), which give practically the same numerical results of the LQ; as well as alternative models, variously based on concepts of saturation of the repair capacity (Sánchez-Reyes, 1992; Cucinotta et al., 2008). Overall, it is generally acknowledged that the biophysical basis of all such models rests on quite speculative assumptions about the microscopic events leading to the observed cell response. Their most important value, notably for the LQ model, rather resides in their empirical utility in dose treatment planning (for a comparison among the various models, see, e.g., Brenner, 2008). However, one cannot say to have learned much about the biophysics of DNA damage from empirical models of this kind.

We used our simulation model to attempt an interpretation of typical cell survival curves, however without including any of the above detailed (but speculative) microscopic assumptions about the typology and evolution of DSB generation. As an example, we

will test the hypothesis (Sánchez-Reyes, 1992; Cucinotta et al., 2008) that the repair probability may be dependent on the dose, by means of some 'saturation' mechanism, which could be further traced back to a molecular origin. However, in our simulations we will not explicitly introduce the saturation hypothesis. Rather, we will fix some damage threshold N_{crit} , and explore the cell survival fraction as a function of the radiation dose and the DSB repair probability r_1 . The other ingredients are those already given in Section 2, namely DSBs are taken to occur independently, with Poisson-like statistics, followed by a simply exponential repair capability. No further fitting is needed, since we use the values of probability (p_1, p_2, r_2) corresponding to the previous fitting (Section 3.1 above) of our own experimental data at the dose of 2 Gy. In this way, we aim at showing (i) that the model is data-independent (since we use data from a particular fitting, to reproduce data obtained in entirely different experiments), and most importantly (ii) that the model can autonomously generate a non-predefined response, thus providing a biophysical interpretation to the experimental data.

Fig. 5 shows the evolution of the cell death fraction as a function of the value of r_1 , for irradiations at different dose levels $\Delta = 1, 2, \dots, 10$ Gy, at the rate of 3 Gy/min. The mortality threshold is fixed at a quite low value, $N_{crit} = 5$, meaning that on average 5 DSBs in a cell are already enough to kill it. Cells are observed for a time of 24 h after the irradiation. For the sake of simplicity, we are using a phase-independent repair rate, i.e. the 'mix' in Fig. 4. All the curves for the various simulations display the same behaviour, namely the death probability is close to 1 for low values of r_1 , and it rapidly decreases around a critical value of r_1 , depending on the dose. Upon increasing r_1 all the curves end up to zero mortality, meaning that the repair probability gets large enough to provide a full healing of DSB damage within the 24 h time window. Note that for the lowest dose simulated of 1 Gy, the plot does not start at 100, since the number of DSBs generated by such a small dose is below $N_{crit} = 5$.

Now, we take some typical cell survival curves from published irradiation experiments, and compare the experimental data to our simulated survival fractions from Fig. 5. Namely, for each value of dose Δ , we extract from the corresponding curve in Fig. 5 the value of r_1 which allows us to best fit the experimental survival fraction at that dose. Fig. 6 shows three such experimental curves. Two are from the work of Sørensen et al. (2011), obtained by irradiation of V79 (black) and FaDu (red) Chinese hamster cells

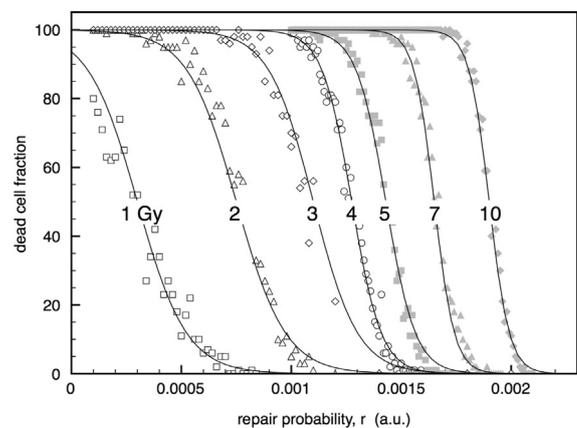


Fig. 5. Plot of the cell death fraction from a colony of $N = 500$ cells, as a function of the DSB repair probability r_1 , for simulated irradiations at dose levels between 1 and 10 Gy (indicated for each set of data), at a rate of 3 Gy/min. Damage probabilities p_1, p_2 , and repair probability r_2 , are fixed at the same values reproducing experimental irradiation data in Fig. 3. Cells are observed for 24 h after the irradiation, and the mortality threshold is fixed at $N_{crit} = 5$ (see Eq. (12)). Continuous curves are best fits with a sigmoidal function, for each set of simulation data.

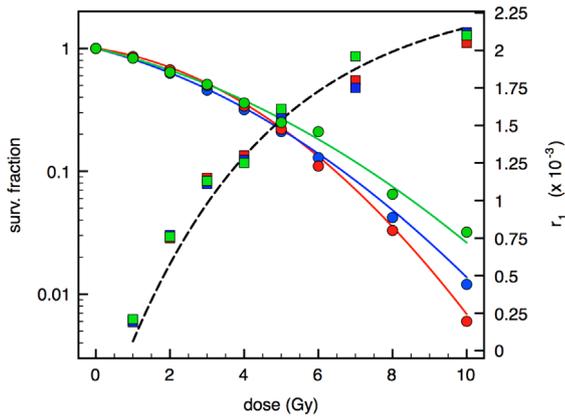


Fig. 6. Left y-axis: plot of the experimental data of survival fraction for V79 (blue dots) and FaDu (red dots) cells, from Sørensen et al. (2011), and for X1 cells (green dots) from Ma et al. (2013). Continuous curves represent a fit to our simulation data. Right y-axis: square symbols: values of r_1 giving the best fits (color curves) to the experimental survival fraction, for each dose value; symbol colors correspond to each experimental and fitted curve. The dashed line is an exponential fit to the r_1 values from the model. (For interpretation of the references to color in this figure caption, the reader is referred to the web version of this paper.)

with a LINAC, at dose rates of 5.01, 9.99 and 29.91 Gy/min (see left y-axis). The three colour curves represent our model fit to the experimental data, as proposed in the original works. In such experiments, no dependence of the survival fraction on the dose rate was evidenced, in fact the LQ fits for the three different rates are practically identical. Note that such dose rates are much larger than those used in classical survival curve experiments by smaller radioactive sources: as an example we include in the Figure also data by Ma et al. (2013) (green) on X1 Chinese hamster cells irradiated by a 250 kV x-ray tube.

In the same Fig. 6, right axis, we also plot the values of r_1 which provide the closest fit to each curve (blue squares for the V79, red squares for the FaDu, green squares for the X1), at each value of dose. It can be seen that the best values of r_1 are not at all constant, but follow a clearly saturating pattern, i.e. increasing steadily at low doses and aiming at a constant value (about $r_1 \sim 2.4 \times 10^{-3}$) at higher doses. The dashed curve in the figure is an exponential fit to these r_1 values, of the type $a - b \exp(-cr_1)$, with $a=2.4$, $b=3$ and $c=0.25$.

The important point here is that our dynamical simulation model is capable of producing survival curves in very good agreement with various sets of experimental data, without making *a priori* assumptions about the biophysical mechanisms underlying. In a sense, we let the cells ‘choose’ their behaviour, and we look which particular behaviour corresponds to the observed experimental data. In this way, the model suggests a biophysical mechanism underlying the observed shape of the survival curves: rather than by making hypotheses of, e.g., linear-plus-quadratic components (of doubtful physical origin), the model only includes biologically observable damage (SSBs and DSBs, although only the latter are considered as lethal, according to the current knowledge). With this initial hypothesis, the model is able to suggest that cells may adopt a molecular repair response that is exponentially saturable. One could then further speculate about the molecular connection, for example imagining that there is a finite supply of repair proteins in the cell nucleus, which fails when the damage is too extended. While we used here this set of computer simulations only as an example of application of the model, a more complete study of this effect is underway, and we defer further considerations to a future work.

3.2. Computational model for ‘bystander’ effect in radiobiology : long-range versus short-range diffusion

The so-called ‘bystander’ action, firstly observed in the early ‘90s (see Blyth and Sykes, 2001; Little, 2003, for reviews), is seen to occur in experiments performed under widely different conditions, both in vitro and in vivo, and it appears to fall under two broad categories: (i) *local* action over short cell-cell distances; (ii) *global* action over longer distances.

The cellular effects of such bystander actions generally involve an upregulation of the metabolism of co-affected cells, such as the oxidative pathways (Narayanan et al., 1997; Mothersill and Seymour, 1998), the p53 damage-response pathway (Azzam et al., 1998), increased levels of interleukin-8 (Narayanan et al., 1999), AP endonuclease (Iyer and Lehnert, 2002), TGF β 1 (Iyer and Lehnert, 2000), and others. Notably, increase in cell proliferation activity has often been associated with such increased metabolism (Iyer and Lehnert, 2000, 2002; Gerashchenko and Howell, 2003, 2005). This latter finding motivates a second application of our model, in order to show the importance of coupling the damage-repair capability with diffusion and cell topology.

We performed a series of coupled irradiation-diffusion simulations on a sample colony of $N_c=500$ cells, with the same probability parameters as above. To simulate co-culture of irradiated and non-irradiated cells, randomly picked sub-populations corresponding to 5, 10, 20, 50, 75 and 90% of the colony were irradiated with the same protocol of Section 3.1. The bystander effect was simulated in the two variants above described, namely (i) local and (ii) global, by allowing the irradiated cells to diffuse a generic pro-mitogenic factor (such as TGF β 1), here labelled B for ‘bystander’, whose concentration c^B is supposed to increase over time in each cell, according to the diffusion equation (3). The source term was set to $s^B=1$ in irradiated cells, and $s^B=0$ elsewhere. The increase in proliferation was linked to the concentration, by shifting each local cell clock as:

$$t_d' = t_d + \Delta t(1 + \gamma c^B) \quad (15)$$

with γ an empirical efficiency factor, ranging from 0.1 to 2. In this way, cells that accumulate larger concentrations of the ‘B’ factor may anticipate their time to the next division, up to twice the normal rate. In the same spirit, we also tested the effect of a cytotoxic factor (e.g., reactive oxygen species, hydrogen peroxide, nitric oxide) leading to proliferation arrest, by setting $\gamma = -0.5$, -1 . Moreover, we tested the possibility that the ‘B’ factor may also induce cell death when exceeding some threshold (for example, $c^B \geq 0.9$), by relating the concentration to P_{death} in Eq. (12) as

$$P_{death} = \frac{1}{1 + e^{-100(c^B - 0.9)}} \quad (16)$$

Then, the ‘local’ variant of the bystander effect (i) was represented by assigning diffusion coefficients $D^B=1$ and $D^B \simeq 0$ (in arbitrary units) to the irradiated and non-irradiated cells, respectively. The ‘global’ bystander effect (ii) was instead represented by assigning $D^B=1$ to irradiated, and increasing values of $D^B=10^{-3}$, 10^{-2} , or 10^{-1} to the surrounding, non-irradiated cells. An example of the typical effect of such choices is represented in the 2D cell maps of Fig. 7.

The results of the simulations are summarised in Figs. 8 and 9. The first one shows the duplication rate of non-irradiated cells after 24 h, in a colony in which variable proportions of irradiated cells (in abscissa) are randomly mixed. The four panels correspond to the four values of $D^B \simeq 0$, $= 0.001$, 0.01 , 0.1 . The curves in each panel correspond to different values of γ , the coefficient relating the concentration of the B factor to the cell duplication rate. From such data, only minor differences between the ‘local’ and ‘global’ bystander effect could be inferred: all the families of curves

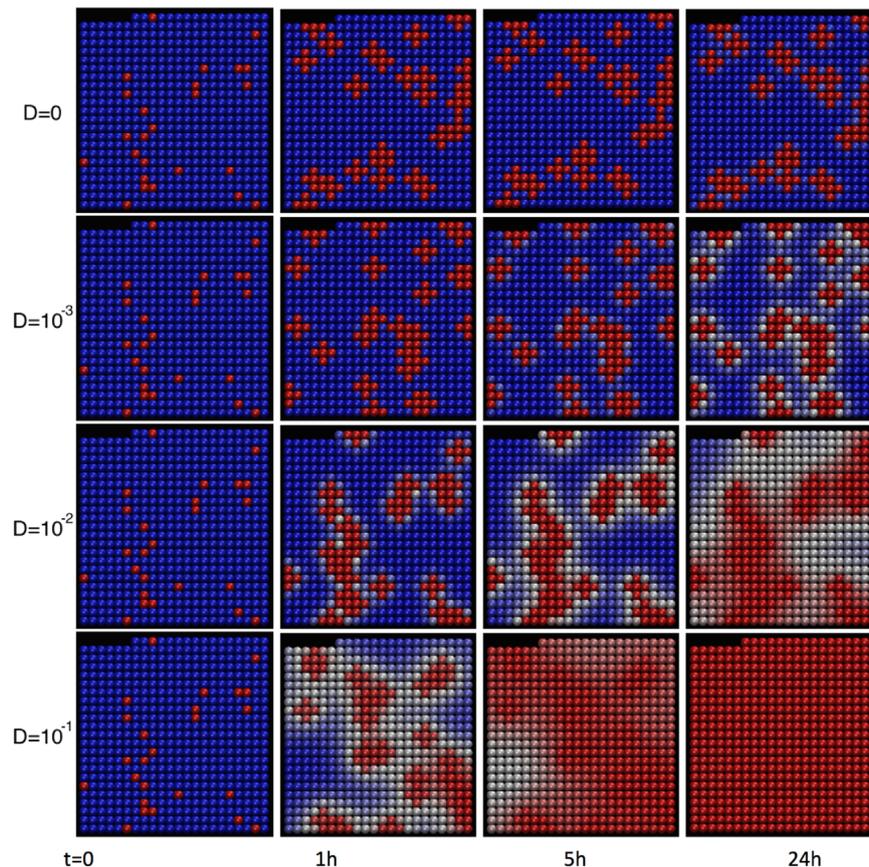


Fig. 7. Concentration maps from the simulation of bystander effect in a colony of 500 cells with a randomly distributed 5% fraction of irradiated cells. Rows from top to bottom: diffusion coefficient for non-irradiated cells $D^B \sim 0, 0.001, 0.01, 0.1$. The top row represents a *local* bystander effect, requiring direct cell-cell contact; the lower rows correspond to the *global* effect, with increasing extracellular diffusion velocities. Columns from left to right: simulation time $t=0, 1, 5, 24$ h. The continuous color coding represents the concentration of the secreted factor in each cell (blue $c^B=0$, white $c^B=0.5$, red $c^B=1$). (For interpretation of the references to color in this figure caption, the reader is referred to the web version of this paper.)

resemble each other, all showing a sizeable increase in the duplication rate as a function of γ (the normal proliferation rate in the absence of irradiation would be 2 after 24 h). For γ approaching zero, the proliferation rate goes back to constant, around its normal value of 2. Negative values of γ give instead reduced proliferation rates, with the cell population being reduced, since part of the cells go into the arrested condition. In the lower limit ($\gamma \simeq -1$), the rate tends to 1, i.e. there is no duplication at all. The case in which the B factor induces mortality is the curve labelled 'm' in each panel. It can be seen that in this case the cell colony can be completely killed after 24 h (the population count goes to zero). In this latter case, some correlation between the fraction of irradiated cells and the diffusion coefficient exists: at the smaller values of D^B , the mortality rate is nearly exponential with the fraction of irradiated cells, while at larger diffusion coefficients the mortality grows very quickly, and already a fraction of 10 to 20% of irradiated cells is sufficient to propagate very effectively the simulated cytotoxic factor. However, by comparing the upper-left and the lower-right panel, at least a qualitative difference can be appreciated, the local effect showing a dependence of the proliferation rate on the fraction of irradiated cells, which is practically absent in the global effect at the highest values of D^B .

One has to look at Fig. 9 to obtain a much clearer evidence of a sizeable difference between the local and global versions of the bystander effect. The plot represents two families of curves, each one corresponding to different values of γ as in the previous Fig. 8. However, in this case the abscissa represents the values of D^B in logarithmic scale. The two families of curves are for two extreme

values of fractions of irradiated cells in the colony, a small 5% (red lines, dashed) and a rather large 75% (black lines, full). It can be clearly appreciated that, for a high fraction of irradiated cells, both the local and global effect give results that are practically independent on the value of D^B , the main parameter to determine the proliferation rate being only the value of γ . However, at the smallest fractions, and for the larger values of $\gamma > 1$, there is a marked dependence of the proliferation on D^B , the 'global' bystander effect leading to much higher proliferation rate than the 'local', indeed more than doubled for $\gamma=2$. This dependence seems less apparent for the negative values of γ .

Such a result of the model is not at all surprising, and could have been readily predicted simply on the basis of logical reasoning: if the number of 'source' (i.e. irradiated) cells is large, there is practically no difference between a local and a global action; if the number of source cells is quite sparse, instead, a global action is necessarily more effective than a local one, for a given amount of time. Being only a test problem, this is an indirect proof that the model works correctly. Clearly, our naive, two-parameter representation of the bystander effect is far from capturing the complexity of this elusive phenomenon, which requires instead a much deeper investigation. We used it here, just for the sake of demonstrating the power of a theoretical model of cell evolution capable of coupling damage and repair information at the single-cell level, together with spatial and topological information at the multicellular level.

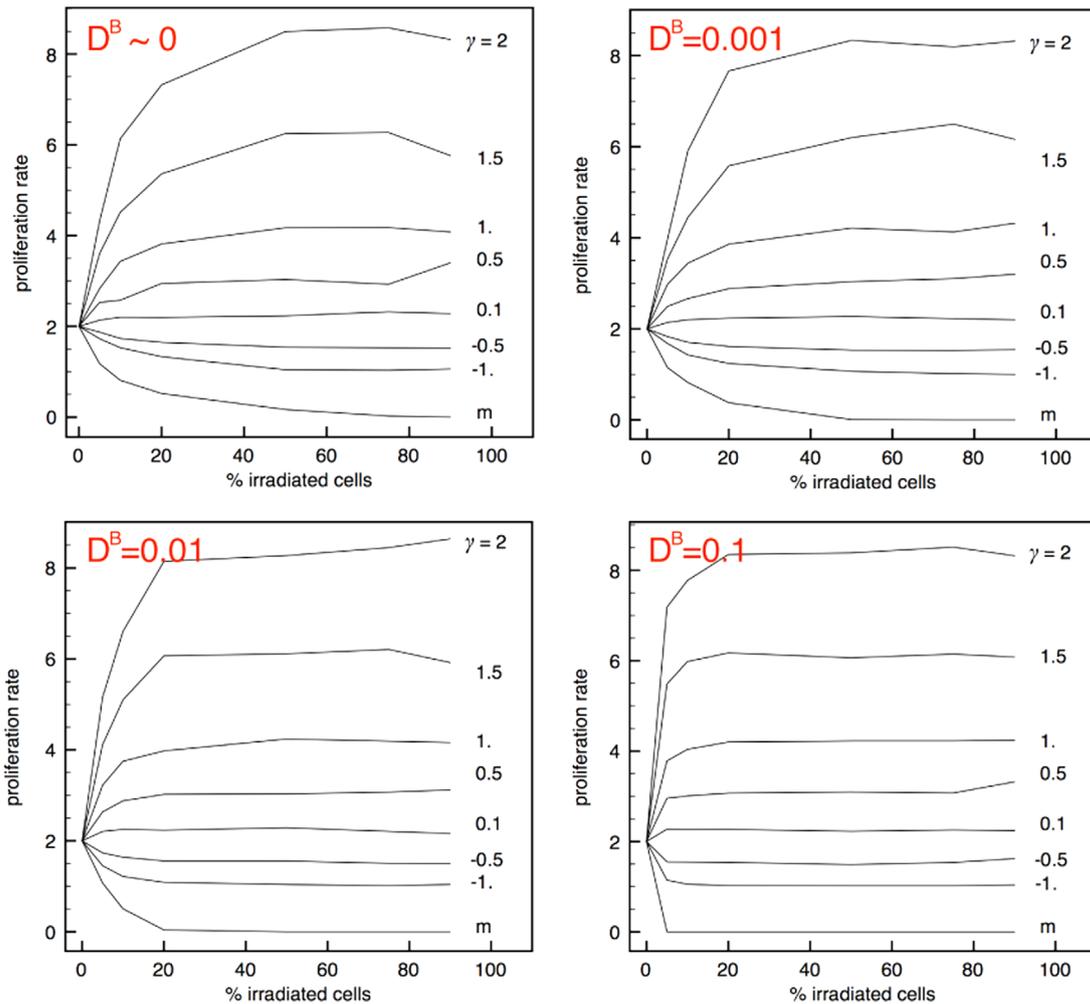


Fig. 8. Plot of the duplication rate of non-irradiated cells after 24 h, in a colony of 500 cells including fractions of irradiated cells ranging from 5 to 90%. A normal duplication rate corresponds to 2. In each simulation, the diffusion coefficient of irradiated cells is always $D^B = 1$. The diffusion coefficient of non-irradiated cells varies in each panel. Top row, left $D^B \sim 0$, right $D^B = 0.001$; bottom row, left $D^B = 0.01$, right $D^B = 0.1$. In each panel, the various curves correspond to different values of γ in Eq. (15), except for the curve indicated as 'm', which corresponds to the population decrease in the presence of a mortality-inducing factor (Eq. (16)).

4. Discussion and conclusions

In this work we developed and tested an agent-based model of cell evolution under the action of cytotoxic treatments, aimed at including the major features of cell cycle and proliferation, cell damage and repair, chemical diffusion. In this first implementation of the model, the cells-agents live in a two-dimensional lattice, with a diamond-neighbour topology. Cell evolution is mathematically driven by a Markov chain, with cells taking on a series of discrete internal states from 'normal' to 'inactive' (or 'dead'). Probabilistic laws are introduced for each type of event a cell can undergo during its life cycle: duplication, arrest, apoptosis, senescence, damage, healing. The system is simulated with a time-forward explicit algorithm, with a Monte Carlo sampling of the various probability distributions.

We firstly calibrated some of the free parameters with a series of cell irradiation experiments, carried out in a clinical LINAC at 20 MV and quite high fluence (~ 3 Gy/min). Single- (SSB) and double-strand breaks (DSB) in irradiated cells were counted by means of automated image analysis, after staining with XRCC1 (for SSBs) and 53BP1 (for DSBs) proteins. The resulting damage and repair kinetics were deduced, and included in the model parametrisation.

The very first test of the model was directed at reobtaining the cell survival curves from a number of published low- and high-

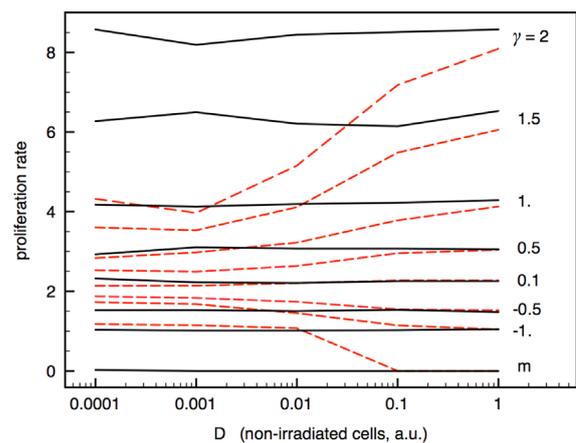


Fig. 9. Plot of the duplication rate after 24 h, in a colony of 500 cells including 5% (red, dashed) or 75% (black, full curves) fraction of irradiated cells, as a function of the diffusion coefficient of non-irradiated cells. The diffusion coefficient of irradiated cells is always $D^B = 1$. The various curves correspond to different values of γ in Eq. (15). (For interpretation of the references to color in this figure caption, the reader is referred to the web version of this paper.)

dose irradiation experiments. Such curves are generally interpreted on the basis of the so-called 'linear-quadratic' model, which presumes the DSB damage to occur in two different forms, a

single-hit and a double-hit mode (hence the two terms in the LQ model). We could obtain a very good representation of the same cell survival curves, however without assuming any special hypothesis about the types of DSBs or other. We only let the cell DSB-repair probability as a variable, and we obtained that in order to fit the experiments such a probability must saturate as a function of the increasing dose, as previously suggested, e.g., by Sánchez-Reyes (1992) and Cucinotta et al. (2008). This simple test already shows the power of the simulation method, in that it is capable of suggesting a biophysical behaviour that cells may adopt (an exponentially saturating DSBs repair capability), instead of relying on various pre-conceived hypotheses.

As a second test, we attempted to simulate the so-called 'bystander' effect in radiotherapy, namely the possibility that non-irradiated cells located in proximity of irradiated cells may develop a sequence of metabolic response similar to these latter. We tested the two extreme, opposing hypotheses of a 'local' bystander effect, activated by short-range intercellular diffusion, versus a 'global' effect, activated by the long-range diffusion, e.g., of some factor secreted from the irradiated cells in the extracellular fluid. Even if our simulation was exceedingly simple, and many important factors were explicitly neglected, we could demonstrate some sizeable difference in the proliferation rate of non-irradiated cells, the increase in proliferation being much larger for the global than for the local effect, at least for a relatively small initial fraction of irradiated cells in contact with normal cells.

In this first study, primarily devoted to introducing and testing our agent-based model, we did not use the information about the other type of lesions already included in the algorithm, namely the single-strand breaks, for which we anyway performed the experimental calibration in the same way as for the double-strand breaks. We are however planning to use such a feature in a forthcoming study of tumour dormancy, as well as the other features not yet fully developed, such as the cell motility, which would be an essential ingredient for modelling both in vitro and in vivo cancer growth.

Acknowledgements

M.T. thanks the Region Nord/Pas-de-Calais and the President of the University of Lille for a doctoral grant. C.A. and F.C. thank the SIRIC OncoLille for the grants SENDORMIR (Emergents 2013) and MODCEL (Emergents 2014), and grant INCa-DGOS-Inserm 6041. Computer resources provided by CINES Montpellier, under contract c2015-077225. We gratefully thank T. Lacornerie (Centre 'Oscar Lambret', Lille) for his kind assistance with irradiation manipulations, N. Martin and J. Nassour (Institut de Biologie de Lille) for their kind assistance with biology experiments, and G. Deloison for his help in HCS Microscopy, as well as the Bio-imaging Centre of Lille (<http://www.bicel.org>) for making available the necessary equipment.

References

- Albright, N., 1989. Markov formulation of the repair-misrepair model of cell survival. *Radiat. Res.* 118, 1–20.
- Anderson, A.R., Chaplain, M.A., Rejniak, K.A., 2007. *Single-Cell-Based Models in Biology and Medicine*. Springer, Basel, Switzerland.
- Azzam, E.I., De Toledo, S.M., Gooding, T., Little, J.B., 1998. Intercellular communication is involved in the bystander regulation of gene expression in human cells exposed to very low fluences of alpha particles. *Radiat. Res.* 150, 497–504.
- Blyth, B.J., Sykes, P.J., 2001. Radiation-induced bystander effects: what are they, and how relevant are they to human radiation exposures?. *Radiat. Res.* 176, 139–157.
- Brenner, D.J., 2008. The linear-quadratic model is an appropriate methodology for determining iso-effective doses at large doses per fraction. *Semin. Radiat. Oncol.* 18, 234–239.
- Brunton, G.F., Wheldon, T.E., 1980. The Gompertz equation and the construction of tumor growth curves. *Cell Tissue Kinet.* 13, 455–460.
- Byrne, H., Drasdo, D., 2009. Individual-based and continuum models of growing cell populations: a comparison. *J. Math. Biol.* 58, 657–687.
- Calini, V., Urani, C., Camatini, M., 2002. Comet assay evaluation of DNA single- and double-strand breaks induction and repair in C3H10T1/2 cells. *Cell Biol. Toxicol.* 18, 369–379.
- Chaplain, M.A., Powathil, G.G., 2015. Multiscale modelling of cancer progression and treatment control: the role of intracellular heterogeneities in chemotherapy treatment. *Biophys. Rev. Lett.* 10, 97.
- Cilfone, N.A., Kirschner, D.E., Linderman, J.J., 2015. Strategies for efficient numerical implementation of hybrid multi-scale agent-based models to describe biological systems. *Cell. Mol. Bioeng.* 8, 119–136.
- Cucinotta, F.A., Pluth, J.M., Anderson, J.A., Harper, J.V., O'Neill, P., 2008. Biochemical kinetics model of DSB repair and induction of γ -H2AX foci by non-homologous end joining. *Radiat. Res.* 169, 214–222.
- Curtis, S.B., 1986. Lethal and potentially lethal lesions induced by radiation—a unified repair model. *Radiat. Res.* 106, 252–270; Erratum, *Radiat. Res.* 119, 584 (1989).
- Dale, R.G., 1985. The application of the linear-quadratic dose-effect equation to fractionated and protracted radiotherapy. *Br. J. Radiol.* 58, 515–528.
- Deisboeck, T.S., Wang, Z., Macklin, P., Cristini, V., 2011. Multiscale cancer modeling. *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 13, 127–155.
- Dikomey, E., Dahm-Daphi, J., Brammer, I., Martensen, R., Kaina, B., 1998. Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines. *Int. J. Radiat. Biol.* 73, 269–278.
- Edelman, L.B., Eddy, J.A., Price, N.D., 2010. In-silico models of cancer. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2, 438–459.
- El-Awady, R.A., Dikomey, E., Dahm-Daphi, J., 2003. Radiosensitivity of human tumour cells is correlated with the induction but not with the repair of DNA double-strand breaks. *Br. J. Cancer* 89, 593–601.
- Cristofalo, V.J., Lorenzini, A., Allen, R.G., Torres, C., Tresini, M., 2004. Replicative senescence: a critical review. *Mech. Ageing Dev.* 125, 827–848.
- Georgescu, W., Osseiran, A., Rojec, M., Liu, Y., Bombrun, M., Tang, J., Costes, S.V., 2015. Characterizing the DNA damage response by cell tracking algorithms and cell features classification using high-content time-lapse analysis. *PLoS ONE* 10, e0129438.
- Gerashchenko, B.I., Howell, R.W., 2003. Cell proximity is a prerequisite for the proliferative response of bystander cells co-cultured with cells irradiated with gamma-rays. *Cytometry* 56A, 71–80.
- Gerashchenko, B.I., Howell, R.W., 2005. Bystander cell proliferation is modulated by the number of adjacent cells that were exposed to ionizing radiation. *Cytometry* 66A, 62–70.
- Gevertz, J.L., Aminzare, Z., Norton K.-A., Pérez-Velázquez, J., Volkening, A., Rejniak, K.A., 2015. Emergence of anti-cancer drug resistance: exploring the importance of the microenvironmental niche via a spatial model. In: *Applications of Dynamical Systems in Biology and Medicine*, vol. 158, pp. 1–34 (The IMA Volumes in Mathematics and its Applications).
- Gosselin, K., Deruy, E., Martien, S., Vercamer, C., Bouali, F., Dujardin, T., Slomianny, C., Houel-Renault, L., Chelli, F., De Launoit, Y., Abbadie, C., 2009. Senescent keratinocytes die by autophagic programmed cell death. *Am. J. Pathol.* 174, 423–435.
- Graeber, T.G., Osmanian, C., Jacks, T., et al., 1996. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 379, 88–91.
- Greaves, M., 2015. Evolutionary determinants of cancer. *Cancer Discov.* 5, 806–820.
- Hayflick, G., 1965. The limited in vitro lifetime of human diploid cells strains. *Exp. Cell Res.* 37, 614–636.
- Hart, J.R., Zhang, Y., Liao, L., Ueno, L., Du, L., Jonkers, M., Yates, J.R., Vogt, P.K., 2015. The butterfly effect in cancer: a single base mutation can remodel the cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, 1131–1136.
- Iyer, R., Lehnert, B.E., 2002. Alpha-particle-induced increases in the radioresistance of normal human bystander cells. *Radiat. Res.* 157, 3–7.
- Iyer, R., Lehnert, B.E., 2000. Factors underlying the cell growth-related bystander responses to α -particles. *Cancer Res.* 60, 1290–1298.
- Kansal, A.R., Torquato, S., Harsh, G.R., Chiocca, E.A., Deisboeck, T.S., 2000. Simulated brain tumor growth dynamics using a three-dimensional cellular automaton. *J. Theor. Biol.* 203, 367–382.
- Keinj, R., Bastogne, T., Vallois, P., 2011. Multinomial model-based formulations of TCP and NTCP for radiotherapy treatment planning. *J. Theor. Biol.* 279, 59–64.
- Kellerer, A.M., 1985. Fundamentals of microdosimetry. In: Kase, K., Bjarngard, B., Attix, F. (eds.), *The Dosimetry of Ionizing Radiation*. Academic Press, Orlando, USA, 1985, pp. 78–162.
- Kempf, H., Hatzikirou, H., Bleicher, M., Meyer-Hermann, M., 2013. In-silico analysis of cell cycle synchronisation effects in radiotherapy of tumour spheroids. *PLoS Comput. Biol.* 9, e1003295.
- Kutalik, Z., Razaf, M., Baranyi, J., 2005. Connection between stochastic and deterministic modelling of microbial growth. *J. Theor. Biol.* 232, 285–299.
- Kutcher, G.J., 1996. Quantitative plan evaluation: TCP/NTCP models. *Front. Radiat. Ther. Oncol.* 29, 67–80.
- Little, J.B., 2003. Genomic instability and bystander effects: a historical perspective. *Oncogene* 22, 6978–6987.

- Lobrich, M., Ipkeme, S., Haub, P., Weber, K.J., Kiefer, J., 1993. DNA double-strand break induction in yeast by X-rays and alpha-particles measured by pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Radiat. Biol.* 64, 539–546.
- Lowengrub, J.S., Frieboes, H.B., Jin, F., Chuang, Y.L., Li, X., Macklin, P., 2010. Nonlinear modelling of cancer: bridging the gap between cells and tumours. *Nonlinearity*, 23, R1–91.
- Ma, N.-Y., Tinganelli, W., Maier, A., Durante, M., Kraft-Weyrather, W., 2013. Influence of chronic hypoxia and radiation quality on cell survival. *J. Radiat. Res.* 54 (Suppl.), i13–i22.
- Mao, Z., Bozzella, M., Sulanov, A., Gorbunova, V., 2008. DNA repair by non-homologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell Cycle* 7, 2902–2906.
- Moreira, J., Deutsch, A., 2002. Cellular automaton models of tumor development: a critical review. *Adv. Complex Syst.* 5, 247–267.
- Mothersill, C., Seymour, C.B., 1998. Cell-cell contact during gamma irradiation is not required to induce a bystander effect in normal human keratinocytes: evidence for release during irradiation of a signal controlling survival into the medium. *Radiat. Res.* 149, 256–262.
- Narayanan, P.K., Goodwin, E.H., Lehnert, B.E., 1997. α -particles initiate biological production of superoxide anions and hydrogen peroxide in human cells. *Cancer Res.* 57, 3963–3971.
- Narayanan, P.K., LaRue, K.E.A., Goodwin, E.H., Lehnert, B.E., 1999. Alpha particles induce the production of interleukin-8 by human cells. *Radiat. Res.* 152, 57–63.
- Powathil, G.G., Adamson, D.J., Chaplain, M.A., 2013. Towards predicting the response of a solid tumour to chemotherapy and radiotherapy treatments: clinical insights from a computational model. *PLoS Comput. Biol.* 9, e1003120.
- Roos, W.P., Kaina, B., 2006. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol. Med.* 12, 440–450.
- Rubinow, S.I., 1968. A maturity-time representation for cell populations. *Biophys. J.* 8, 1055–1073.
- Sachs, R.K., Hlatky, L., Hahnfeldt, P., Chen, P.-L., 1990. Incorporating dose-rate effects in Markov radiation survival cell models. *Radiat. Res.* 124, 216–226.
- Sachs, R.K., Hlatky, L.R., Hahnfeldt, P., 2001. Simple ODE models of tumor growth and anti-angiogenic or radiation treatment. *Math. Comput. Model.* 33, 1297–1305.
- Sánchez-Reyes, A., 1992. A simple model of radiation action in cells based on a repair saturation mechanism. *Radiat. Res.* 130, 139–147.
- Schultz, L.B., Chehab, N.H., Malikzay, A., Halazonetis, T.D., 2000. p53 binding protein 1 (53bp1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J. Cell Biol.* 151, 1381–1390.
- Silva, A.S., Gatenby, R.A., 2010. A theoretical quantitative model for evolution of cancer chemotherapy resistance. *Biol. Direct.* 5, 25.
- Sørensen, B.S., Vestergaard, A., Overgaard, J., Praestegaard, L.J., 2011. Dependence of cell survival on instantaneous dose rate of a linear accelerator. *Radiother. Oncol.* 101, 223–225.
- Stewart, R.D., 2001. Two-lesion kinetic model of double-strand break rejoining and cell killing. *Radiat. Res.* 156, 365–378.
- Stukalin, E.B., Aifuwa, I., Kim, J.S., Wirtz, D., Sun, S.X., 2013. Age-dependent stochastic models for understanding population fluctuations in continuously cultured cells. *J. R. Soc. Interface* 10, 0325.
- Takashima, Y., Sakuraba, M., Koizumi, T., Sakamoto, H., Hayashi, M., Honma, M., 2009. Dependence of DNA double strand break repair pathways on cell cycle phase in human lymphoblastoid cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 50, 815–822.
- Tracqui, P., 2009. Biophysical models of tumour growth. *Rep. Prog. Phys.* 72, 056701.
- Tobias, C.A., 1985. The repair-misrepair model in radiobiology: comparison to other models. *Radiat. Res.* 104 (Suppl.), 77–95.
- Wang, Z., Butner, J.D., Kerketta, R., Cristini, V., Deisboeck, T.S., 2015. Simulating cancer growth with multiscale agent-based modeling. *Semin. Cancer Biol.* 30, 70–78.
- Wlodek, D., Hittelman, W.N., 1988. The relationship of DNA and chromosome damage to survival of synchronized X-irradiated L5178Y cells: II. Repair. *Radiat. Res.* 115, 566–575.
- Zdanova, S., Bernard, D., Debacq-Chainiaux, F., Martien, S., Gosselin, K., Vercamer, C., Chelli, F., Toussaint, O., Abbadie, C., 2007. Normal or stress-induced fibroblast senescence involves COX-2 activity. *Exp. Cell Res.* 313, 3046–3056.

RÉSUMÉ

Radiothérapie du cancer: de la physique de l'ADN irradié à la dormance tumorale

La radiothérapie utilise les rayonnements ionisants dans le but d'éradiquer les cellules cancéreuses, principalement par la génération de cassures double-brin (CDB) de l'ADN, et secondairement de cassures simple-brin (CSB). Un des effets secondaires de la radiothérapie est l'émergence de seconds cancers, préférentiellement en bordure du volume traité, où des cellules normales reçoivent un niveau de dose non létal. Ces seconds sarcomes se développent principalement après une période de latence de 3 à 20 ans. Par le biais d'expériences de biologie cellulaire, nous avons déterminé la distribution des dommages à l'ADN (CSB et CDB) dans le champ d'irradiation, et en bordure de celui-ci, après différentes conditions d'irradiation. Nous avons aussi évalué les dommages à l'ADN et l'induction de sénescence après un traitement fractionné. La détection des foyers XRCC1 et 53BP1 par immunofluorescence a été utilisée comme marqueurs des CSB et CDB respectivement. Enfin, la sénescence a été évaluée par la mesure de l'activité de l'enzyme SA-beta-galactosidase. Nous avons en parallèle développé un modèle théorique d'évolution cellulaire, avec pour objectif le suivi des cellules après l'action d'un traitement génotoxique, tel que la radiothérapie ou la chimiothérapie. Les caractéristiques principales de cycle cellulaire, d'endommagement et de réparation de l'ADN, et de la diffusion chimique ont été incluses dans ce modèle, basé sur la méthode statistique des « agents » et résolution stochastique par méthode Monte Carlo ; l'évolution cellulaire est décrite par des chaînes de Markov. Deux applications du modèle sont présentées : courbes de survie cellulaire et simulation de l'effet « bystander ».

Mots clés : radiobiologie, cancer radio-induits, dommages à l'ADN, sénescence, modélisation de population cellulaire, modèles statistiques.