

12

Biomarqueurs de la réponse individuelle aux radiations et biomarqueurs associés aux cancers radio-induits

La recherche sur les biomarqueurs de la réponse individuelle aux radiations, sous toutes ses formes, est un pilier majeur de la radiobiologie. La complexité des mécanismes moléculaires, cellulaires et tissulaires rend difficile le développement de tests prédictifs. De plus, la confusion entre les notions de radiosensibilité (risque de réactions tissulaires liées à la mort cellulaire, observées par exemple en radiothérapie) et de radiosusceptibilité (risque de cancer radio-induit lié à la transformation cellulaire) n'a pas facilité la définition du champ de validité des biomarqueurs. Enfin, le fait que la réponse à l'exposition aux radiations soit également liée à la dose pose le problème de la sensibilité des biomarqueurs à prédire des événements qui sont d'autant plus rares que la dose est faible.

Parallèlement à la recherche sur les biomarqueurs de la réponse individuelle aux radiations qui concernent les tissus sains irradiés et qui peuvent être considérés comme faisant partie des tests dosimétriques, la recherche sur les spécificités des tumeurs radio-induites a ouvert un autre axe d'investigation, celui des signatures radio-induites. L'induction de cancers post-irradiation est largement documentée sur des modèles animaux et chez l'Homme. En particulier, l'accroissement des risques d'incidence et de mortalité par cancer a été estimé pour les survivants de la bombe atomique à Hiroshima et Nagasaki. Cependant, la fréquence des effets stochastiques induits par les rayonnements ionisants est très faible et, à ce jour, il n'est pas possible de distinguer, sur des critères histologiques, les cancers radio-induits de ceux qui se développent spontanément, contrairement à ce qui est observé après exposition à l'amiante ; le mésothéliome étant une tumeur tellement rare spontanément que sa détection est fortement corrélée à l'exposition aux fibres d'amiante. Les cassures double-brin de l'ADN, induites par l'irradiation et

mal réparées, peuvent induire de nombreuses altérations (telles que des remaniements chromosomiques) dont certaines pourraient être spécifiques et constituer des signatures moléculaires potentielles. Ainsi, de nombreux travaux se sont orientés vers la recherche de signatures moléculaires afin de distinguer un cancer radio-induit d'un cancer spontané. Deux grands types de signatures moléculaires sont distingués : les biomarqueurs spécifiques d'un cancer radio-induit et les biomarqueurs génériques quel que soit le type de tumeur.

Ce chapitre présente en premier lieu les biomarqueurs moléculaires de la réponse individuelle aux radiations (radiosensibilité, radiosusceptibilité, radiodégénérescence) ; il fait ensuite le point sur les biomarqueurs moléculaires associés aux cancers radio-induits (biomarqueurs spécifiques et biomarqueurs génériques ou globaux).

Biomarqueurs de la réponse individuelle aux radiations

Biomarqueurs de la radiosensibilité

En ce qui concerne la recherche des biomarqueurs de la radiosensibilité, chaque étape moléculaire, cellulaire et tissulaire de la réponse aux radiations a été investiguée et il apparaît que les tests fonctionnels basés sur la mesure de la fonctionnalité de certaines étapes de la réponse aux radiations, comme la réparation des cassures chromosomiques ou des cassures de l'ADN, sont les seuls qui montrent des corrélations quantitatives avec la radiosensibilité clinique (Cornforth et Bedford, 1987 ; Iliakis, 1991 ; Fernet et Hall, 2008 ; Bodgi et Foray, 2016 ; Foray et coll., 2016 ; Granzotto et coll., 2016). Au-delà des tests fonctionnels, des approches géniques ont également été développées, notamment à travers la recherche de polymorphismes : à ce jour, aucun consensus sur un SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) ou un groupe de SNP n'a été obtenu pour fournir une corrélation quantitative significative avec la radiosensibilité clinique (Barnett et coll., 2012). En plus de la difficulté à prédire la radiosensibilité, les techniques actuelles sont peu sensibles pour des doses faibles. Il apparaît cependant que seules la cytogénétique et les techniques de mesure de cassures de l'ADN aient un seuil de détectabilité de l'ordre du mGy (Rothkamm et Lobrich, 2003 ; Foray et coll., 2016).

Survie clonogénique : un test standard trop lourd à mettre en place à grande échelle

En 1981, une corrélation quantitative entre la radiosensibilité clinique des tumeurs (quantifiée *in vivo* par la réduction du volume tumoral après

irradiation) et la radiosensibilité cellulaire (évaluée *in vitro* par des tests de survie clonogénique)⁸³ a été mise en évidence (Cox et coll., 1995). En ce qui concerne les tissus sains, la principale difficulté pour obtenir une corrélation quantitative similaire entre les aspects cliniques et la survie clonogénique est la définition d'un critère clinique fiable pour quantifier la radiosensibilité clinique de ces tissus. Il faudra ainsi attendre les années 2000 pour que des échelles cliniques de sévérité tissulaire deviennent consensuelles comme c'est le cas pour les échelles CTCAE⁸⁴ (National Institutes of Health, National Cancer Institute, 2010) et RTOG (Cox et coll., 1995) qui définissent la réponse clinique aux radiations en 6 grades (0 : pas de réactions ; 5 : décès). Toutefois, quand bien même ces échelles sont désormais utilisées, l'utilisation d'essais clonogéniques à grande échelle a été critiquée par la lourdeur des protocoles expérimentaux : ces tests nécessitent un grand savoir-faire technique pour la culture cellulaire, un grand nombre de cellules et de conditions de contrôle, et un temps considérable, notamment pour attendre la formation de colonies (10-15 jours) (Joubert et Foray, 2006). Notons enfin que pour provoquer des réactions tissulaires de radiosensibilité au niveau clinique qui soient mesurables sur les échelles CTCAE et RTOG, les doses de radiation doivent être suffisamment élevées (généralement de l'ordre du Gy), ce qui limite également l'application de ces tests.

Tests prédictifs basés sur la mort cellulaire

Les tests de survie clonogénique ont l'avantage de refléter la mort radiobiologique indépendamment de sa nature. Comme évoqué dans le chapitre 11 « Mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la réponse aux radiations ionisantes », on peut identifier trois types de mort cellulaire : la mort mitotique, la sénescence et l'apoptose. Si le tissu testé montre naturellement plusieurs types de mort, il faudra évidemment préférer le test de survie clonogénique pour mieux prédire la radiosensibilité.

Comme la mort mitotique, quantifiable par les micronoyaux, est l'une des morts les plus fréquentes pour les tissus sains qui peuvent encore proliférer sous irradiation, il est logique que les micronoyaux soient les premiers paramètres cytogénétiques quantitativement corrélés à la radiosensibilité (Fenech, 2000). Toutefois, bien que les micronoyaux peuvent être utilisés en dosimétrie biologique, le protocole expérimental requis pour obtenir les

83. Le test de survie clonogénique est basé sur l'ensemencement d'un nombre donné de cellules qui sont irradiées à différentes doses puis du comptage de colonies quelques jours plus tard. Seules les cellules formant des colonies après irradiation sont considérées comme vivantes. Le résultat est généralement présenté sous la forme dite de courbe de survie.

84. CTCAE : *Common Terminology Criteria for Adverse Events* ; RTOG : *Radiation Therapy Oncology Group*.

micronoyaux est trop lourd pour l'appliquer en routine pour la prédiction de la radiosensibilité (Roy et coll., 2006). De même, les seuils de dose pour observer des micronoyaux sont élevés (supérieur à 0,1 Gy), ce qui limite l'utilisation pour prédire la radiosensibilité.

En ce qui concerne la sénescence (c'est-à-dire un arrêt permanent du cycle cellulaire en phase G1) (Hall et coll., 2017), il en existe deux types : la « sénescence répllicative » et la « sénescence prématurée ». La première dépend du raccourcissement des télomères alors que ce n'est pas le cas de la seconde (Darroudi et coll., 1998). Bien que l'expression de la kinase cycline-dépendante (CDKN1A/p21) soit généralement liée à la sénescence, des biomarqueurs permettant de quantifier la sénescence restent à définir car il n'existe toujours pas de corrélation générale entre la sénescence et la radiosensibilité. Il faut d'ailleurs noter que les tests d'exclusion de colorants (par exemple au bleu trypan) parfois utilisés pour remplacer les tests de survie clonogéniques ne rendent pas compte de la sénescence car les cellules dont le cycle cellulaire est arrêté de manière irréversible ne sont pas clonogéniques mais métabolisent et peuvent exclure les colorants (Sumantran, 2011). De plus, comme la dose de radiation pour provoquer un arrêt du cycle permanent doit être suffisamment élevée (de l'ordre du Gy pour les cellules humaines), les tests basés sur l'expression radio-induite de p21 ne seront valables que pour prédire des effets cliniques évidents et bien caractérisés.

L'apoptose est l'une des voies de mort cellulaire les plus documentées, mais elle est fortement dépendante des tissus. Par exemple, les lymphocytes meurent fréquemment par apoptose, alors que c'est rarement le cas pour les fibroblastes. Il n'y a toujours pas de corrélation quantifiée entre la radiosensibilité cellulaire et l'apoptose (Ormerod et coll., 1971 ; Granzotto et coll., 2011). D'ailleurs, il y a plusieurs exemples à cette dernière assertion dans les syndromes génétiques. En particulier, les fibroblastes issus de patients souffrant d'ataxie telangiectasie (mutations homozygotes d'ATM) sont hyper-radiosensibles alors qu'ils ne montrent pas d'apoptose. De même, les fibroblastes radorésistants issus de patients souffrant du syndrome de Li-Fraumeni (mutations hétérozygotes de p53) ne provoquent aucun corps apoptotique (Kohn et coll., 1991), alors que le taux des micronoyaux après radiation est élevé pour les premiers et bas pour le second (Cedervall et coll., 1995). En ce qui concerne la prédiction de la radiosensibilité clinique, la corrélation négative entre l'apoptose et les événements tissulaires indésirables après radiothérapie a été observée dans les lymphocytes irradiés : plus le taux d'apoptose est faible, plus la radiosensibilité est élevée (Lobrich et coll., 1995 ; Joubert et coll., 2008), ce qui va à l'encontre du principe selon lequel plus il y a de mort, plus la radiosensibilité est élevée. Ce test a fait l'objet d'un certain

nombre d'interrogations. Une autre étude avec un test d'apoptose sur des lymphocytes chez une grande série de patientes atteintes d'un cancer du sein n'a montré aucune association avec des événements de tissus mammaires normaux (Roti Roti et Wright, 1987). Le fait que les dosages de l'apoptose soient effectués avec des cellules sanguines est en contradiction flagrante avec la description de la radiosensibilité clinique puisque les événements tissulaires indésirables observés après la radiothérapie concernent principalement des tissus conjonctifs (à savoir des fibroblastes).

Tests prédictifs basés sur la cytogénétique

Comme ces tests sont également utilisés en dosimétrie biologique, ils seront discutés dans le chapitre correspondant. Il faut simplement retenir que les tests basés sur les cassures chromosomiques ont permis de prédire, au moins partiellement, la radiosensibilité clinique (Johnson et Rao, 1970 ; Evans, 1972 ; Grote et coll., 1981 ; Carney, 1999 ; Duker, 2002 ; Pernot et coll., 2012 ; Hall et coll., 2017). En particulier, en 1987, Cornforth et Bedford ont montré qu'une seule cassure chromosomique (issue d'une cassure double-brin) suffisait à entraîner la mort d'une cellule humaine irradiée (Cornforth et Bedford, 1987). Sur cette base quantitative, c'est la façon de mesurer les cassures chromosomiques qui a changé au fil du temps. Par exemple, à la place des techniques classiques de coloration des chromosomes par certains colorants comme le Giemsa, on utilise aujourd'hui des technologies plus fines qui permettent de distinguer chaque chromosome avec une couleur spécifique : c'est la technique du FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*) (Darroudi et coll., 1998 ; Leonard et coll., 2005). On peut également court-circuiter les arrêts du cycle en quantifiant les cassures chromosomiques sur des cellules en G0/G1 en condensant prématurément la chromatine : c'est la technique PCC (*Premature Chromosome Condensation*) (Darroudi et coll., 1998 ; Leonard et coll., 2005). Plus récemment, la technique CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) permet une vue cytogénétique d'ensemble du génome de n'importe quelle cellule (Hall et coll., 2017). Toutefois, les données CGH fournissent la liste des cassures et aberrations chromosomiques spontanées pouvant éventuellement refléter une instabilité génomique, mais ces données, le plus souvent obtenues à l'état spontané, ne permettent pas encore de prédire les événements potentiellement mortels induits par les radiations. Par ailleurs, toutes les techniques de cytogénétique actuelles sont basées sur des protocoles expérimentaux assez lourds en ce qui concerne la préparation des cellules. De plus, tributaire d'événements radio-induits rares (les cassures chromosomiques), leur seuil de détectabilité ne dépasse pas les doses inférieures à 0,1 Gy quand au moins 1 000 cellules sont analysées (Hall et coll., 2017).

Tests prédictifs basés sur les dommages de l'ADN

Au lieu de quantifier les cassures chromosomiques, ce qui nécessite souvent d'attendre la mitose, les radiobiologistes ont développé des techniques basées sur la détection de cassures de l'ADN. On peut en distinguer 4 types : celles basées sur la discrimination des fragments d'ADN par leur taille, celles basées sur la condensation/décondensation de la chromatine, celles basées sur l'utilisation de plasmides, et celles, plus récentes, basées sur l'immunofluorescence et le suivi des acteurs protéiques de la signalisation ou de la réparation de l'ADN (Granzotto et coll., 2011 ; Foray et coll., 2016 ; Hall et coll., 2017).

La première difficulté conceptuelle à lever réside dans la nature même des cassures : ce sont des trous et donc on ne peut les quantifier directement en tant que tels mais plutôt par le nombre de fragments qu'ils engendrent. Ainsi, les premières techniques développées pour quantifier les cassures double-brin furent basées sur la discrimination des fragments radio-induits de l'ADN par leur taille. Ce fut le cas de la sédimentation en gradient de sucrose (Ormerod et Lehmann, 1971), l'élution neutre (Kohn, 1991) ou l'électrophorèse en champs pulsés (Iliakis, 1991 ; Cedervall et coll., 1995). Ainsi, avec de telles techniques, une réparation consistait à la fois en une diminution du nombre de fragments mais aussi en une augmentation de leur taille moyenne (Cedervall et coll., 1995). Ce principe biochimique fournissait un grand avantage : ces techniques n'étaient pas sensibles à certains modes de réparation spécifiques puisque seule l'étape finale « cassure réparée » ou « cassure non-réparée » était quantifiée. En revanche, la fidélité de la réparation ne pouvait pas être déduite directement de ces techniques (Lobrich et coll., 1995). L'autre inconvénient de ces techniques est qu'elles nécessitaient l'utilisation de doses de plusieurs dizaines de Gy pour augmenter la population de petits fragments : ces techniques sont inapplicables à grande échelle même si certaines ont permis d'établir les premières corrélations quantitatives entre la survie clonogénique et les cassures double-brin non-réparées (Joubert et coll., 2008).

Le deuxième type de techniques est basé sur la relaxation de la chromatine : les cassures simple- et double-brin induites par les radiations peuvent entraîner une décondensation de la chromatine. Ainsi, la taille apparente du noyau augmente en fonction du nombre de cassures de l'ADN. Le noyau peut former un halo fluorescent après coloration si on ajoute un agent intercalant comme l'iode de propidium. L'augmentation du diamètre du noyau avec la dose est donc le résultat de la combinaison de l'effet intercalant, de la relaxation de la chromatine et de la présence de cassures dans l'ADN (Roti Roti et Wright, 1987). Une électrophorèse peut être également

appliquée à une cellule individuelle lysée, fixée sur lame et colorée par un intercalant ; il s'agit du test de la comète. Sous l'effet d'un champ électrique, on observe alors par fluorescence l'image d'une comète dont la dimension du cœur (halo) et de la queue dépend du nombre de fragments d'ADN. L'inconvénient de ces techniques est qu'elles mêlent à la fois effet sur la chromatine et réparation des fragments de l'ADN, qui peuvent être moléculairement indépendants. De plus, il faut également une dose suffisamment élevée (de l'ordre du Gy) pour augmenter la détectabilité de la technique (Olive, 2009 ; Speit et Hartmann, 2005).

Le troisième type de techniques est basé sur l'utilisation de plasmides portant des gènes de résistance à des antibiotiques et sur lesquels des cassures double-brin peuvent être produites à des sites spécifiques (dits de restriction) par des nucléases. Bien que de tels tests ont été développés pour leur spécificité aux modes de réparation par suture (Thacker, 1989 ; Baumann et West, 1998) ou bien par recombinaison (Meyn, 1993), l'activité concomitante de ces deux processus peut générer des artéfacts et aboutir à de mauvaises interprétations. Il est à noter par exemple que l'usage de matrice d'ADN de faible longueur comme les plasmides peut artificiellement augmenter la fidélité d'une réparation qui se passe au hasard comme c'est le cas de la recombinaison. Alors que ces tests utilisant des plasmides peuvent révéler des défauts de réparation spécifiques à partir d'extraits cellulaires, ils sont difficilement intégrables dans une démarche où la dose de radiation est un des paramètres car les cassures de l'ADN y sont générées à l'unité et sur une séquence donnée par des enzymes de restriction et non par une irradiation qui produirait les cassures de l'ADN aléatoirement sur toute la séquence du plasmide (Granzotto et coll., 2011).

Le quatrième type de techniques regroupe toutes les immunofluorescences de marqueurs de cassures ou d'acteurs de la réparation dont la relocalisation est radio-induite (généralement suite à une phosphorylation). Par nature, ces techniques sont strictement spécifiques à la relocalisation/délocalisation des marqueurs considérés et nécessitent donc une connaissance fondamentale documentée des étapes de la réparation et de la signalisation des dommages de l'ADN. En 2003, il a été montré que les cassures double-brin induites par les radiations ionisantes pouvaient être déterminées à partir du nombre de foci nucléaires formés par la protéine histone variante H2AX phosphorylée sur sa sérine 139 (γ H2AX). Ces foci γ H2AX étaient facilement quantifiables par immunofluorescence (Rothkamm et Lobrich, 2003). La technique γ H2AX a révolutionné notre estimation des événements induisant la mort cellulaire, car elle permet la détermination de chaque cassure double-brin individuelle dans un noyau cellulaire avec une corrélation significative

entre les cassures et les foci γ H2AX, notamment chez les mammifères où la réparation par suture, dépendant de la phosphorylation d'H2AX, est prépondérante. Comme environ 40 cassures double-brin sont induites par Gy et par cellule humaine, 1 γ H2AX foci par cellule représente environ une dose de 25 mGy ($1/40^{\text{e}}$ de Gy). En analysant plus d'une centaine de noyaux, cette technique repousse considérablement le seuil de détectabilité des autres techniques qui restait fixé à environ 0,1 Gy. Aujourd'hui, on peut considérer que la technique γ H2AX constitue un outil puissant pour étudier les phénomènes à faible dose dans la gamme du mGy (Rothkamm et Lobrich, 2003). En 2008, en analysant une quarantaine de lignées cellulaires issues d'une dizaine de maladies génétiques, Joubert et coll. ont obtenu une relation inverse entre la survie clonogénique à 2 Gy et le nombre de cassures double-brin non réparées (Joubert et coll., 2008). Cependant, à l'exception de la détection de maladies génétiques associées à une hyper-radiosensibilité exceptionnelle, la technique γ H2AX ne permet pas d'établir une corrélation significative entre les cassures double-brin non-réparées et tous les grades de sévérité des échelles CTCAE ou RTOG qui reflètent la radiosensibilité au niveau clinique. En effet, le nombre de cassures double-brin non-réparées allant généralement de 0 à 8 par cellule, il est trop faible pour refléter significativement toute la radiosensibilité humaine (Granzotto et coll., 2016).

En 2016, il a été suggéré que la vitesse de transit que la protéine ATM effectue du cytoplasme au noyau après irradiation pourrait conditionner la réponse clinique aux radiations. La protéine kinase ATM est responsable de la phosphorylation de H2AX et son activation est l'un des événements biochimiques les plus précoces après irradiation, en amont de la formation des foci γ H2AX. Généralement sous la forme de dimères ATM qui s'autophosphorylent (pATM), le stress oxydatif causé par l'irradiation monomériserait le complexe pATM-pATM, ce qui permettrait aux monomères de migrer dans le noyau où la reconnaissance des cassures double-brin de l'ADN serait assurée par la phosphorylation de H2AX. Une corrélation quantitative significative a été établie entre le nombre de foci pATM et les grades de sévérité CTCAE et RTOG. Le modèle du transit d'ATM permettrait également d'apporter une explication mécanistique au phénomène d'hypersensibilité aux faibles doses observé entre 1 et 200 mGy (Bodgi et coll., 2013 ; Ferlazzo et coll., 2014 ; Granzotto et coll., 2016). Toutefois, basée sur l'immunofluorescence, la technique pATM nécessite une amplification cellulaire qui peut retarder le diagnostic final de plusieurs semaines. Plus récemment, l'immunofluorescence a été substituée à des tests ELISA pour accélérer l'obtention des résultats et permettre le diagnostic de radiosensibilité en moins de 3 jours (Pereira et coll., 2018). Mais ce test plus rapide est moins fiable que la technique pATM basée sur l'immunofluorescence (Vogin et coll., 2018) :

les techniques de prédiction de la radiosensibilité basée sur la détection des dommages de l'ADN ont peut-être permis d'investiguer des doses plus faibles mais souvent au détriment de la robustesse statistique.

Tests basés sur la génomique

Si l'hypothèse selon laquelle l'expression d'un gène donné est capable de prédire toute la gamme de radiosensibilité humaine est pertinente, cela implique *stricto sensu* que l'expression de ce gène change avec la dose comme la survie clonogénique. Cependant, les principales protéines requises pour les événements radio-induits précoces comme la reconnaissance ou la réparation des dommages de l'ADN, sont très abondantes et leur expression ne varie pas avec la dose. En revanche, certaines protéines, en aval de la réponse aux radiations (c'est-à-dire les protéines impliquées dans les arrêts du cycle cellulaire ou des différentes voies de morts cellulaires spécifiques) sont très radio-inductibles. En utilisant la technologie des puces à ADN, Svensson et coll. (2006) ont trouvé que, chez 38 patients atteints de cancer de la prostate (21 présentant des complications graves et 17 ne présentant aucun symptôme), l'expression des gènes les plus significatifs de la radiosensibilité n'était pas liée à la toxicité des radiations (Svensson et coll., 2006). Dans un travail plus récent, il a été montré que, parmi 4 gènes dont l'expression est radio-inductible (*CDKN1A*, *GADD45A*, *CCNB1* et *BBC3*), l'expression basale et radio-induite de *CDKN1A* est la seule qui permet de prédire correctement la radiosensibilité (Badie et coll., 2008). Cependant, des mutations de *CDKN1A* ou de la protéine p53 dont elle dépend ne sont pas associées à une forte radiosensibilité. Ainsi, cette revue de la littérature suggère que, même si quelques corrélations quantitatives existent entre l'expression de certains gènes et la radiosensibilité, celles-ci ne sont valables que pour une gamme limitée de doses, de radiosensibilités et/ou de syndromes (Foray et coll., 2016).

Un des acquis majeurs de ces dernières années est que la réponse aux radiations est un phénomène multigénique. Si l'action d'une protéine, comme ATM, située très en amont dans la succession des événements moléculaires précoces qui suit une irradiation peut être prédictive de la radiosensibilité, celle d'une protéine située plus en aval peut ne pas refléter toute la diversité de la radiosensibilité humaine. De même, les études de la relation entre génotype et phénotype de plusieurs maladies génétiques associées à une radiosensibilité ont montré que certaines mutations d'un même gène peuvent ne pas être associées au même niveau de radiosensibilité. Inversement, des mutations de gènes différents peuvent aboutir au même degré de radiosensibilité. C'est notamment le cas pour les syndromes de Bloom et de Xeroderma

pigmentosum (Joubert et coll., 2008 ; Foray et coll., 2016). Ainsi, les recherches qui se focalisent sur des mutations de gènes (approche génique) restent confrontées à la diversité des réponses individuelles qui ne dépendent pas forcément d'un seul gène. À l'inverse, l'approche fonctionnelle qui mesure une fonction prédit un degré de radiosensibilité sans donner d'information sur le(s) gène(s) en cause. Un autre avantage de l'approche fonctionnelle est qu'elle permet de rendre compte du lien qui existe entre la dose et l'effet alors qu'une mutation de gène détectée sans irradiation sera toujours la même quelle que soit la dose reçue.

En dépit de l'apport considérable de l'approche fonctionnelle pour la prédiction de la radiosensibilité, l'engouement massif pour la génomique concerne depuis quelques années la radiobiologie et la prédiction de la réponse individuelle aux radiations, notamment à travers l'étude des polymorphismes, et plus particulièrement les polymorphismes à simple nucléotide (SNP). Un SNP est une variation de séquence d'un gène observé chez une minorité d'individus qui représente généralement moins de 10 % de l'espèce. Les SNP sont donc des changements de nucléotides mais qui, pour la très grande majorité des cas, ne codent pas pour des acides aminés différents et donc ne change pas la conformation de la protéine produite par le gène en question. Chaque individu possède environ 30 millions de SNP et 1 SNP est observé tout les 300 paires de bases. Certains SNP des protéines ATM, XRCC1, XRCC3, SOD2, RAD21, TGF-B1 et PARP ont été identifiés et éventuellement associés à une réponse anormale aux radiations (De Ruyck et coll., 2006 ; Azria et coll., 2008 ; Willems et coll., 2008). Cependant, certains patients avec les mêmes SNP peuvent présenter des événements tissulaires indésirables de gravité différente. Aucune corrélation significative n'a été observée entre les SNP et la radiosensibilité individuelle reflétée par les grades CTCAE ou RTOG, et un aperçu récent confirme l'absence de corrélation pour un grand nombre de SNP différents (Barnett et coll., 2012). Globalement, les données disponibles présentent des preuves prometteuses que certains SNP peuvent être des facteurs aggravants de certains aspects de la réponse aux radiations, mais aucun lien quantitatif et causal n'a été proposé à ce jour.

Dans le cadre de la même approche génique, certains groupes de recherche ont lancé récemment des études de séquençage intégral du génome (GWAS, *Genome Wide Association Studies*) pour identifier des variants génétiques communs associés à une toxicité tardive en radiothérapie. Ces très grandes études ont jusqu'à présent fourni des preuves de telles associations qui semblent être spécifiques à un site tumoral. Cependant, la puissance statistique reste faible et les GWAS ne permettent pas une évaluation individuelle de

la radiosensibilité (Rosenstein et coll., 2014). Ainsi, l'ère du « *big data* » en radiogénomique a commencé, pour un succès encore inconnu en radiobiologie (Barnett et coll., 2014). Une revue récente sur la radiogénomique appliquée à l'identification de patients cancéreux présentant un risque d'effets indésirables après la radiothérapie est disponible mais ne semble pas tenir compte de la nécessité de connaître la relation dose-effet (Kerns et coll., 2014).

Biomarqueurs de la radiosusceptibilité

Au cours des 20 dernières années, la confusion entre « radiosensibilité » et « radiosusceptibilité » a été si forte que certains biomarqueurs de radiosensibilité décrits plus haut ont également été utilisés pour estimer la radiosusceptibilité et l'instabilité génomique. Pourtant, certains biomarqueurs sont incompatibles avec les 2 notions. En particulier, les tests de survie clonogénique, tests de référence pour la radiosensibilité, ne sont pas pertinents pour évaluer la transformation cellulaire (par exemple, les mutations hétérozygotes de p53 et les mutations homozygotes de ATM sont associées à une très forte prédisposition au cancer mais aussi à la radiorésistance pour les premières et à l'hyper-radiosensibilité pour les secondes) (Foray et coll., 2016).

La prédisposition au cancer est liée à l'instabilité génomique. Celle-ci se produit spontanément ou après irradiation. L'instabilité génomique peut être causée par le phénomène d'hyper-recombinaison, systématiquement observé dans toutes les maladies sujettes au cancer et qui est issue du manque de contrôle des voies de réparation par recombinaison (Meyn, 1993). Cependant, le lien quantitatif entre hyper-recombinaison spontanée et radio-induite reste à déterminer.

Une autre difficulté dans la recherche de biomarqueurs spécifiques de la radiosusceptibilité est la définition d'un critère clinique quantifiable. En ce qui concerne la prédisposition au cancer spontané ou radio-induit, ce ne peut être le grade de sévérité CTCAE ou RTOG mais plutôt la survenue de cancer à un temps donné ou un excès de risque relatif issu des données épidémiologiques (Hall et coll., 2017). Ce changement de critère clinique change également la nature de la relation dose-effet. Ainsi, comme pour les biomarqueurs de la radiosensibilité, les approches fonctionnelles et géniques existent. En effet, les progrès de la génétique et la meilleure connaissance des gènes de prédisposition au cancer ont permis de mettre en évidence un facteur individuel de la prédisposition au cancer (Gatti, 1991 ; Tutt et Ashworth, 2002 ; Scott, 2004 ; Jeggo et Lobrich, 2007). De plus, les relations entre génotypes et phénotypes suggèrent également la diversité des niveaux

de risque de cancer (Kraemer et coll., 2007 ; Foray et coll., 2012 ; Meric-Bernstam et coll., 2013). La radiosusceptibilité individuelle doit être étudiée à l'aide d'analyses fonctionnelles spécifiques de certaines étapes de la réponse aux radiations comme la mauvaise réparation des cassures de l'ADN ou les manques de contrôle des arrêts du cycle cellulaire après irradiation (HPA, 2013).

Biomarqueurs de mauvaise réparation des cassures de l'ADN

Il existe de nombreux travaux qui suggèrent que si la radiosensibilité est provoquée par des cassures de l'ADN non réparées, la prédisposition au cancer leur est associée (Jeggo et Lobrich, 2007 ; Foray et coll., 2016). La détection des erreurs d'ADN a été l'un des défis majeurs des quatre dernières décennies. À chaque avancée technologique dans les tests de réparation des cassures double-brin de l'ADN, une solution pour évaluer les erreurs de réparation a été proposée :

- une variante de l'électrophorèse en champs pulsés associée à un *Southern blot* a permis d'obtenir les premières cinétiques de mauvaise réparation de l'ADN. Toutefois, des doses importantes (de l'ordre du Gy) sont nécessaires (Lobrich et coll., 1995) ;
- une variante de la méthode des plasmides basée sur un plasmide circulaire portant deux copies mutées d'un même gène permet de mesurer le processus d'hyper-recombinaison (Thacker, 1989 ; Meyn, 1993). En utilisant de tels tests, une corrélation entre le taux d'hyper-recombinaison et la prédisposition au cancer a été révélée (Joubert et coll., 2008) ;
- un certain nombre de marqueurs d'immunofluorescence ont été testés avec des cellules issues de maladies génétiques associées au cancer. Cependant, il n'existe pas encore de consensus sur ce (ou ces) biomarqueur(s) pour refléter la prédisposition au cancer. À ce jour, à l'exception du nombre de foci de MRE11 par cellule irradiée (Joubert et coll., 2008), aucun autre marqueur spécifique de la radiosusceptibilité n'a été mis en évidence.

Test en G2

La perte de contrôle du cycle cellulaire est une des étapes majeures de l'instabilité génomique et de la prédisposition au cancer. Tous les syndromes associés à une forte prédisposition au cancer testés ont montré un défaut du contrôle de l'arrêt en G2/M. Le test en G2 (anciennement appelé test de radiosensibilité chromosomique G2) a été développé par Parshad pour détecter les individus porteurs de gènes prédisposant au risque de cancer (Parshad et coll., 1983 ; Sanford et coll., 1989 ; Riches et coll., 2001). Ce

test a été appliqué pour détecter une prédisposition aux cancers du sein (Parshad et coll., 1983 ; Scott, 2004 ; Baeyens et coll., 2005), cancers juvéniles (Baria et coll., 2002 ; Curwen et coll., 2005), cancers colorectaux (Baria et coll., 2001), cancers de la tête et du cou et des cavités buccales (De Ruyck et coll., 2008). Bien que le test en G2 permette une prédiction fiable de la prédisposition au cancer, son seuil de détectabilité est au-dessus d'une fraction de Gy (Foray et coll., 2016).

Biomarqueurs génomiques

L'activation de la voie ATM/CHK2/p53 par les cassures radio-induites de l'ADN conduit à un arrêt du cycle cellulaire et éventuellement à la mort cellulaire par la transcription de gènes comprenant *CDKN1A* et *BBC3*. Une mesure de l'expression de *CDKN1A* et de *BBC3* dans les lymphocytes irradiés a montré que le nombre de copies de gènes et l'induction de la transcription étaient linéairement liés à la dose et corrélés à l'occurrence du cancer (Kabacik et coll., 2011). Toutefois, cette corrélation n'est pas validée pour tous les syndromes : en reprenant les mêmes exemples que précédemment, rappelons en effet que les mutations hétérozygotes de *p53* (syndrome de Li-Fraumeni) et les mutations homozygotes d'*ATM* diminuent l'expression de *CDKN1A* mais conduisent à un risque de cancer quantitativement différent. Ainsi, de tels essais peuvent ne pas être pertinents pour toutes les mutations géniques associées à un risque élevé de cancer. Bien qu'une expression génique ou une signature du transcriptome puisse discriminer certains cancers sporadiques des cancers de la thyroïde et des sarcomes post-radiothérapie (Hadj-Hamou et coll., 2011 ; Ory et coll., 2011), il n'y a pas encore de biomarqueurs spécifiques de la radiosusceptibilité.

L'approche génique la plus simple consiste en la recherche de mutations de gènes de prédisposition au cancer dans la séquence d'ADN. L'hyper-recombinaison peut aussi conduire à de nombreux réarrangements dans les séquences d'ADN. En particulier, certains groupes de recherche se sont intéressés à la combinaison de SNP qui pourraient, ensemble, constituer un signe spécifique d'instabilité génomique. Toutefois, qu'ils soient pris séparément ou ensemble, les SNP n'ont pas encore fourni de preuves solides pour les considérer comme des biomarqueurs de la radiosusceptibilité (Zschenker et coll., 2010 ; Foray et coll., 2016).

Biomarqueurs de la radiodégénérescence

En plus des effets de radiosensibilité et de radiosusceptibilité, les radiations ionisantes peuvent causer d'autres effets non cancéreux observables à des

doses faibles (ICRP, 2012). C'est le cas notamment des cataractes (Ainsbury et coll., 2016 ; Hamada et Sato, 2016 ; Shore, 2016) et des effets cardiovasculaires (Boerma et coll., 2016 ; Little, 2016), généralement issus d'un vieillissement accéléré des tissus par l'accumulation d'effets sub-létaux. Malheureusement, plus que pour la radiosensibilité et la radiosusceptibilité, les mécanismes à l'origine de ces affections sont mal connus et donc les biomarqueurs qui les prédiraient ne sont pas encore définis.

En effet, aucun biomarqueur spécifique des cataractes radio-induites n'a été rapporté, mais un rapport de 2015 montre que l'oxydation spécifique du cristallin peut être mise en évidence à la dose de 5 Gy (Kim et coll., 2015). D'autres marqueurs liés au stress oxydatif et au vieillissement, tels que le raccourcissement des télomères dans les cellules du sang périphérique, pourraient également être utiles (Babizhayev et coll., 2011 ; Reste et coll., 2014).

Enfin, les biomarqueurs spécifiques des problèmes cardiovasculaires induits par les radiations pourraient aussi être liés au stress oxydatif et au vieillissement à travers la sénescence et des dysfonctions de la mitochondrie (Mina-mino et Komuro, 2008 ; Chen et Zweier, 2014). Des recherches sur des peptides plasmatiques spécifiques, comme la troponine T, ont été initiées sans toutefois aboutir à un consensus (Wondergem et coll., 2001 ; D'Errico et coll., 2012 ; Gomez et coll., 2014 ; Skytta et coll., 2015).

Biomarqueurs associés aux cancers radio-induits

Biomarqueurs moléculaires spécifiques d'un cancer radio-induit

Les travaux de recherche de biomarqueurs moléculaires spécifiques d'un cancer radio-induit ont été menés pour le cancer de la thyroïde ; quelques travaux ont été menés pour le cancer du sein. Ces études ont reposé sur différentes analyses (réarrangements chromosomiques, biomarqueurs du cycle cellulaire, altérations génomiques, variation d'expression génique) qui, au cours du temps, ont évolué vers des approches à plus grande échelle.

Biomarqueurs moléculaires dans les cancers de la thyroïde

Les tumeurs de la thyroïde ont été les premières tumeurs solides montrant une augmentation d'incidence chez les survivants d'Hiroshima et Nagasaki. Le risque de cancer radio-induit de la thyroïde décroît avec l'âge tandis que le risque de tumeur spontanée s'accroît. Parmi les personnes exposées avant l'âge de 20 ans, un tiers des cancers de la thyroïde peuvent être imputables aux radiations. Ces tumeurs, principalement des carcinomes papillaires de la

thyroïde (*Papillary Thyroid Carcinoma*, PTC) ne se distinguent pas des tumeurs sporadiques par des spécificités anatomopathologiques (revue : Iglesias et coll., 2017).

La majorité des études recherchant des signatures moléculaires radio-induites a été réalisée sur des séries de tumeurs provenant de patients ayant été exposés lors de l'accident de Tchernobyl. Les premiers cas de cancers ont été rapportés dès la 4^e année faisant suite à l'accident. Les doses à la thyroïde étaient élevées en raison d'une contamination importante en iode radioactif (¹³¹I), cette dose pouvant être 1 000 à 10 000 fois supérieure à celle aux organes. Il est à noter que la situation a été totalement différente à Fukushima, d'une part car le régime alimentaire était riche en iode et, d'autre part, car les autorités japonaises ont imposé des protections, des restrictions alimentaires et l'évacuation rapide des zones contaminées (revue : Iglesias et coll., 2017).

L'irradiation induisant des cassures double-brin de l'ADN qui, mal réparées, peuvent induire des remaniements chromosomiques, le premier type de signature recherché dans le cancer de la thyroïde suspecté radio-induit a été la détection de remaniements chromosomiques spécifiques dans les tumeurs de personnes exposées lors de l'accident de Tchernobyl.

Une série d'études a porté sur l'évaluation de réarrangements chromosomiques spécifiques impliquant les gènes *RET/PTC*, en particulier des remaniements intrachromosomiques générant la fusion du domaine tyrosine kinase de RET avec le domaine terminal NH2 du produit d'un autre gène. *RET/PTC3* était le réarrangement le plus fréquemment observé dans les PTC identifiés précocement post-Tchernobyl (Fugazzola et coll., 1995), soulevant l'hypothèse d'une signature de l'irradiation. Cependant, il a été montré que les réarrangements *RET/PTC1* étaient plus fréquemment observés dans les cancers se développant plus tardivement post-accident et un tiers des tumeurs suspectées radio-induites ne présentaient aucun de ces réarrangements. Ces remaniements ne permettent pas de définir une signature d'exposition. Très récemment, en utilisant des approches de séquençage NGS (*Next Generation Sequencing*) et RNA-seq, des réarrangements du gène *ALK* (*Anaplastic Lymphoma Kinase*) ont été identifiés dans 10 % des tumeurs de patients exposés suite à l'accident de Tchernobyl ; 31,2 % de ces tumeurs présentaient des remaniements des gènes *ALK/RET* par comparaison à 10,5 % dans les cas sporadiques (Arndt et coll., 2018). Le même type d'analyses (NGS et RNA-seq) effectué sur 65 PTC de patients post-Tchernobyl dont la dose à la thyroïde a été déterminée montre que la dose moyenne pour la détection de mutations ponctuelles est 0,2 Gy (gamme 0,013-1,05 Gy), tandis que la dose moyenne pour la détection de cas de tumeurs avec fusions (réarrangements) est 1,4 Gy (0,009-6,15 Gy). La proportion de tumeurs présentant des fusions

(quels que soient les gènes impliqués) augmente avec la dose, atteignant 87,8 % parmi les individus exposés à 0,3 Gy ou plus (Efanov et coll., 2018). La détection de fusions, bien que ne permettant pas de discriminer entre tumeurs radio-induites et tumeurs sporadiques, est un paramètre orientant vers une suspicion de radio-induction.

L'identification de biomarqueurs a été recherchée dans des études cas-témoins sur des patients ayant développé des tumeurs de la thyroïde post-radiothérapie (il a été considéré que 88 % des PTC observés pour des doses supérieures à 1 Gy reçues durant l'enfance étaient radio-induites) *versus* des tumeurs spontanées (Achille et coll., 2009). Plusieurs biomarqueurs candidats dont l'altération avait déjà été rapportée dans ce type de tumeur ont été analysés sur 100 PTC (26 radio-induits *versus* 74 sporadiques). Plusieurs acteurs du cycle cellulaire (cycline A : phases S et G2 ; cycline B1 : mitose ; cyclines D et E : G1/S ; télomères : sénescence répliquative) ont été testés mais seul le marquage cytoplasmique de la cycline E a présenté une modulation significative, avec une surexpression dans les cas sporadiques. Aucun de ces biomarqueurs permet de différencier les PTC radio-induits des sporadiques (Achille et coll., 2009). Ces résultats suggèrent que la surexpression de la cycline D1 observée dans les cancers de la thyroïde détectés autour du site d'essais nucléaires du Kazakhstan (Semipalatinsk) ne permettrait pas d'établir une relation entre l'exposition aux rayonnements et l'induction de tumeurs, contrairement à ce qui a été proposé par Meirmanov et coll. (2003).

La caractérisation d'altérations génomiques a été effectuée dans une étude en deux étapes sur des patients exposés lors de l'accident de Tchernobyl : un premier lot de 33 tumeurs de la thyroïde issues de patients exposés aux radiations *versus* 19 issues de patients non exposés, a permis de montrer que le gain d'un fragment chromosomique (7q11) sur le chromosome 7 était détecté dans 39 % des tumeurs post-irradiation alors qu'il n'était jamais observé dans les tumeurs spontanées. Ces résultats ont été confirmés dans un deuxième lot de tumeurs utilisées pour la validation (16 provenant de patients exposés et 12 tumeurs sporadiques) (Hess et coll., 2011). L'étude de l'expression de certains gènes candidats localisés dans cette région chromosomique 7q11 a montré la surexpression de CLIP2, une protéine cytoplasmique impliquée dans la fixation des organites aux microtubules. La robustesse de ce biomarqueur a été testée sur plus d'une centaine de tumeurs issues de la *Tchernobyl Tissue Bank* (CTB). L'expression des gènes avoisinants a été quantifiée et la visualisation de la surexpression a été obtenue en immunohistologie, permettant à l'équipe de Hess de proposer CLIP2 comme signature de la radio-induction des tumeurs de la thyroïde (Selmansberger et coll., 2015a). La surexpression de CLIP2 apparaît dépendante de la dose d'irradiation pour les

patients dont l'âge à l'exposition était inférieur à 5 ans et l'âge à l'opération inférieur à 20 ans (Selmansberger et coll., 2015b). Ce biomarqueur a été intégré dans la modélisation de la formation des cancers de la thyroïde et l'estimation du risque de cancers post-Tchernobyl (Kaiser et coll., 2016).

Des analyses de variation d'expression génique à plus grande échelle par des approches transcriptomiques sur puces ont permis d'identifier d'autres signatures moléculaires sur des tumeurs provenant de patients ayant subi des radiothérapies ou post-Tchernobyl.

L'identification de modifications d'expression génique dans les cancers de la thyroïde susceptibles d'avoir été radio-induits *versus* des cancers spontanés a été rapportée par plusieurs équipes. Des résultats contradictoires ont été observés au début de ces études (fin des années 2000), certaines équipes identifiant une signature spécifique (Port et coll., 2007 ; Boltze et coll., 2009 ; Maenhaut et coll., 2011 ; Ory et coll., 2011 ; Ugolin et coll., 2011), d'autres équipes considérant que ces modifications ne sont pas suffisamment spécifiques pour conclure à la radio-induction d'une tumeur (Detours et coll., 2005 ; Maenhaut et coll., 2011 ; Dom et coll., 2012). Toutefois, les stratégies d'études se précisant et la puissance des analyses augmentant, une certaine convergence s'est établie vers l'existence d'une signature moléculaire, y compris pour des équipes ayant conclu autrement quelques années plus tôt (Handkiewicz-Junak et coll., 2016).

En étudiant 11 tumeurs provenant de patients ayant été exposés à l'accident de Tchernobyl et 41 tumeurs sporadiques (cancer papillaire de la thyroïde), l'équipe de M. Abend (Port et coll., 2007) a identifié 7 gènes (*COL13A1*, *KRTAP2-1*, *MMP1*, *SFRP1*, *ESM1*, *BAALC* et *PAGE1*) qui permettent de différencier les deux groupes de tumeurs. Des analyses d'échantillons couplés, tissus sains/tissus tumoraux, montrent l'altération post-irradiation de l'expression de certains gènes, à la fois dans les tissus sains et dans les tissus tumoraux, impliquant en particulier des gènes actifs dans le processus de fixation aux acides nucléiques et des gènes impliqués dans les voies de signalisation *p53*, *EGF*, *FGF* pour les tissus tumoraux. Les patients étant stratifiés par niveau de dose (0,008 à 8 Gy) d'iode-131, certains gènes présenteraient une variation d'expression dépendant de la dose, mais une étude plus exhaustive serait nécessaire pour préciser cette relation-dose-effet.

Les analyses basées sur la quantification de l'expression des gènes sont délicates car les niveaux d'expression varient d'une tumeur à l'autre et l'amplitude est faible pour la plupart des gènes. Afin d'améliorer la robustesse des résultats des données de puces à ADN, l'équipe de S. Chevillard a développé une méthodologie d'identification et de validation (stratégie EMts_2PCA)

dont le principe est basé sur l'utilisation d'algorithmes comprenant des cycles d'apprentissage, d'entraînement et de validation (Ugolin et coll., 2011). L'identification de la signature est réalisée sur une première série comportant au minimum une dizaine de tumeurs à comparer (en appariant les tumeurs en fonction de l'âge, du sexe, du grade et de la dosimétrie). La première partie de l'étude a porté sur des tumeurs de la thyroïde d'histologie différente : FTA (*Follicular Thyroid Adenoma*) et PTC (*Papillary Thyroid Carcinoma*). Chaque type de tumeur incluait des tumeurs spontanées et des tumeurs radio-induites. Au sein de ces groupes de tumeurs, des combinaisons de 5 tumeurs de chaque groupe ont été réalisées à partir du set d'apprentissage/entraînement. Chaque combinaison est utilisée pour : 1) rechercher les marqueurs similairement exprimés et ceux différemment exprimés (sous-signature) et 2) évaluer le potentiel discriminant cette sous-signature pour prédire l'étiologie des tumeurs exclues de cette combinaison (tumeurs d'entraînement) par analyse en composante principale : une sous-signature est retenue si elle permet de classer au moins une des tumeurs d'entraînement. Une signature finale unique est alors définie qui regroupe les marqueurs les plus récurrents dans les sous-signatures retenues et les plus discriminants en fonction des scores d'entraînement (nombre de tumeurs d'entraînement bien classées par les sous-signatures auxquelles le marqueur participe). La signature finale est alors validée par l'estimation de la spécificité et de la sensibilité de prédiction en aveugle de l'étiologie d'un deuxième lot de tumeurs (échantillons indépendants n'ayant pas participé à l'identification de la signature).

Cette stratégie, appliquée aux tumeurs spontanées et radio-induites (post-Tchernobyl pour les tumeurs de la thyroïde et post-radiothérapie pour le cancer du sein), a permis de proposer des signatures moléculaires discriminantes (Ugolin et coll., 2011). Une signature composée de 322 gènes permet de différencier les tumeurs radio-induites de la thyroïde des tumeurs spontanées (pour FTA et PTC). La robustesse de cette signature a été testée en aveugle sur une série indépendante de 29 tumeurs (sporadiques et radio-induites) dont 26 ont été classées correctement selon leur étiologie, confirmant ainsi l'identification d'une signature moléculaire spécifique de la radio-induction pour les cancers de la thyroïde (Ory et coll., 2011).

Biomarqueurs moléculaires dans le cancer du sein

L'équipe de K. Unger a étudié 68 femmes exposées lors de l'accident de Tchernobyl (travailleurs) et ayant développé un cancer du sein. Une étude comparative a été faite sur 68 patientes non-exposées. Des analyses par puce d'hybridation génomique comparative (CGH array, *Comparative Genomic Hybridization array*) puis leur validation par qPCR ont été réalisées. Il a été

identifié neuf altérations dans le nombre de copies d'ADN (CNAs, *DNA copy number alterations*) sur les régions chromosomiques 7q11.22-11.23, 7q21.3, 16q24.3, 17q21.31, 20p11.23-11.21, 1p21.1, 2q35, 2q35, 6p22.2 qui constitueraient une signature d'exposition aux rayonnements pour le cancer du sein (Wilke et coll., 2018).

Biomarqueurs moléculaires globaux de l'irradiation

Cette partie présente des modifications du génome, spécifiques de l'exposition aux radiations ionisantes et indépendantes du type de cancer : l'instabilité chromosomique télomère-induite et la signature mutationnelle.

Instabilité chromosomique télomère-induite

La plus grande partie de la réparation des dommages à l'ADN est terminée dans les quelques heures qui suivent l'irradiation. Lorsqu'une cellule survit, le dogme fut, durant de nombreuses années, que les mutations sont fixées et transmises aux générations cellulaires. Les études sur la transmission des dommages radio-induits à travers plusieurs générations cellulaires ont mis en évidence la complexité des mécanismes impliqués. Il est maintenant démontré que l'accumulation de dommages à l'ADN se poursuit dans la descendance des cellules irradiées. L'instabilité chromosomique détectée dans les fibroblastes humains survivants après irradiation aux ions lourds est caractérisée par des fusions terminales impliquant des chromosomes spécifiques et des déséquilibres chromosomiques engageant ces chromosomes (Sabatier et coll., 1992 ; Martins et coll., 1993). Ces fusions sont liées au raccourcissement des télomères lui-même associé aux divisions cellulaires. Les télomères, à l'extrémité des chromosomes, empêchent les chromosomes de fusionner les uns avec les autres. Dans les cellules somatiques, les télomères raccourcissent à chaque division cellulaire et représentent ainsi une horloge mitotique du processus de sénescence.

Le mécanisme de formation des tumeurs radio-induites basé sur l'instabilité chromosomique télomère-induite, proposé par l'équipe de L. Sabatier, combine la transmission des dommages radio-induits et la sénescence cellulaire qui se produira par la prolifération cellulaire. Après irradiation, la grande majorité des mutations induites sont récessives (Nelson et coll., 1994), c'est-à-dire qu'elles resteront silencieuses jusqu'à l'apparition d'une mutation ou perte de l'hétérozygotie (*Loss Of Heterozygosity*, LOH) sur le second allèle qui pourrait résulter d'un dysfonctionnement télomérique.

Dans le cadre du mécanisme proposé, la radio-oncogenèse se déroulerait comme suit : a) induction de mutations génétiques récessives comme effet direct du rayonnement ; b) accumulation d'altérations génomiques dans les tissus irradiés au cours du vieillissement et prolifération de cellules irradiées et non irradiées ; c) démasquage et amplification de mutations radio-induites ou déjà existantes ; d) perte des fonctions suppressives des tumeurs (aneuploïdie créée par d'importants déséquilibres chromosomiques dus à une altération de l'entretien des télomères suite au vieillissement naturel ou accéléré par des télomères endommagés) ; e) gain en avantage prolifératif ; f) instabilité continue (répétition des étapes b-e) ; g) initiation et progression de la carcinogenèse en plusieurs étapes.

Dans ce mécanisme proposé, qui établit un lien entre les dommages radio-induits et le vieillissement cellulaire, l'hétérogénéité de la longueur du télomère peut avoir un effet amplificateur. En effet, nous ne sommes plus confrontés à des dizaines de milliers de gènes, mais à 92 télomères, dont peu sont courts, qui permettront en quelques étapes de détecter les mutations radio-induites (*via* des déséquilibres chromosomiques ou LOH jusqu'à 100 Mb) pour des milliers de gènes (Ayouaz et coll., 2008 ; Shim et coll., 2014).

Ce type de mécanisme peut constituer une signature de radio-induction lorsque de nombreux déséquilibres chromosomiques sont observés dans une tumeur qui sous sa forme spontanée est caractérisée par des translocations réciproques équilibrées.

Signature de mutations

Behjati et coll. (2016) ont caractérisé des signatures de mutations survenant dans les tissus humains à la suite d'expositions *in vivo* aux rayonnements ionisants dans 12 tumeurs malignes de différents types, toutes fortement suspectées d'être radio-induites (développées post-radiothérapie). Le premier lot était constitué de différentes tumeurs : sein, angiosarcome, sarcome fusocellulaire, ostéosarcome, puis la validation a été réalisée sur des cancers de la prostate. Deux signatures de mutation somatique caractérisent l'exposition aux rayonnements ionisants quel que soit le type de tumeur. Par rapport à 319 tumeurs spontanées, les tumeurs radio-induites comportent une médiane supplémentaire de 201 délétions à l'échelle du génome, de 1 à 100 paires de bases, souvent avec micro-homologie à la jonction. Contrairement aux délétions observées dans les tumeurs spontanées, celles-ci ne présentent aucune variation de densité dans le génome ni de corrélation que ce soit avec des séquences spécifiques, le timing de réplication ou la structure chromatienne. De plus, il est observé une augmentation significative des inversions

équilibrées dans les tumeurs radio-associées. À la fois petites délétions et inversions génèrent des mutations. Ainsi, les rayonnements ionisants génèrent des mutations par des mécanismes spécifiques qui pourraient expliquer leur potentiel cancérigène.

Davidson et coll. (2017) ont montré que la signature mutationnelle constituée par des variants de trinuécléotides est conservée dans les pathologies cancéreuses humaines et murines. Les variants nucléotidiques uniques (SNV) identifiés dans les génomes des cancers étudiés peuvent être traités mathématiquement (déconvolution) (*non-negative matrix factorization*, NMF) en signatures mutationnelles discrètes basées sur des variations de trinuécléotides. La stabilité des signatures de mutations détectées par la méthode d'analyse NMF dépend du nombre de variants disponibles pour l'analyse. Cette étude a comparé les données provenant d'études bien contrôlées réalisées sur des modèles de souris afin de compenser la rareté des données humaines pour certains types de cancer. En effet, les données de séquençage de haute qualité des cancers radio-induits sont particulièrement rares et les processus mutationnels définissant la mutagenèse induite par le rayonnement ionisant *in vivo* restent mal définis. Dans l'analyse NMF de la signature des mutations (basée sur les trinuécléotides), six substitutions possibles sont envisagées, basées sur la pyrimidine en position de référence et dans le contexte de la séquence proximale (un nucléotide 5' et 3'). Les SNVs ainsi que leurs bases voisines en 5' et 3' peuvent être organisées en 96 groupes de trinuécléotides. Pour déterminer si les signatures identifiées chez les sujets exposés au rayonnement ionisant peuvent être différenciées de celles des sujets non exposés, d'autres signatures mutagènes ont été incluses : des données provenant de cancer de la peau (Homme) induit par le rayonnement ultraviolet (UV) et d'un modèle murin de cancers induits par l'uréthane. L'analyse NMF a distingué les trois mutagènes et dans l'analyse regroupée, le rayonnement ionisant a été associé à des signatures mutationnelles communes aux deux espèces. Davidson et coll. (2017) présentent aussi une ré-analyse des 12 tumeurs radio-induites étudiées par Behjati et coll. (2016) ; les signatures UV et irradiation y ont été détectées mais pas la signature uréthane.

Résumé sur les biomarqueurs associés aux cancers radio-induits

Différents travaux de recherche ont permis de progresser dans la capacité à différencier les cancers selon leur étiologie, grâce à des biomarqueurs moléculaires. Deux grands types d'études sont informatives sur une signature moléculaire des cancers radio-induits : d'une part, les caractérisations des profils d'expression génique spécifiques d'un type de cancer donné et, d'autre part,

des modifications du génome spécifiques de l'exposition aux rayonnements ionisants (indépendamment du type de cancer).

Concernant les profils d'expression génique, il existe très peu de convergences entre les études sur les gènes décrits comme dérégulés dans les tumeurs radio-induites. Les hypothèses sous-jacentes à ce manque de convergence peuvent être multiples, qu'il s'agisse des lots étudiés issus de tumeurs différentes, des puces utilisées, de l'analyse des données et des techniques de normalisation. Des intercomparaisons sont indispensables pour consolider les signatures moléculaires permettant de conclure à la radio-induction d'une tumeur ou du moins sa formation à partir de tissu irradié. De plus, des recherches complémentaires sont nécessaires pour estimer l'impact de la dose et du débit de dose sur l'induction de ces signatures.

Concernant les modifications du génome, les tumeurs radio-induites présentent des spécificités moléculaires communes, suggérant la possibilité d'identifier une signature « générale » des tumeurs se développant à partir de cellules ayant été irradiées, sans exclure la possibilité que ces tumeurs aient pu se développer en dehors de tout phénomène d'irradiation.

- ***Limites des approches biostatistiques et bioinformatiques***

En ce qui concerne la recherche des signatures radio-induites, les résultats numériques doivent être toujours interprétés avec une grande prudence par rapport aux approches biostatistiques et bioinformatiques qui sont appliquées. En effet, le nombre de gènes, le nombre de mutations par gène et de combinaisons de mutations sont très fréquemment plus élevés que le nombre d'échantillons, ce qui génère des biais inévitables. Ainsi, des combinaisons d'une centaine de signatures moléculaires communes sur quelques dizaines de tumeurs peuvent être toujours obtenues par le fruit du hasard sans qu'un même lien causal puisse les unir. C'est pourquoi les recherches de signatures radio-induites devraient toujours être accompagnées par des critères de confiance basés sur la contribution du hasard statistique dans les choix méthodologiques et des combinaisons possibles en fonction du nombre d'échantillons. Malheureusement, encore peu d'études statistiques sont accompagnées d'un tel calcul.

Conclusion

La quantification du risque radio-induit nécessite le développement de biomarqueurs de la réponse individuelle aux radiations tant sur les tissus sains (pour prédire les effets de radiosensibilité, radiosusceptibilité et

radiodégénérescence) que sur les tumeurs (pour mettre en évidence leur origine radio-induite par la recherche de signatures spécifiques). Cependant, la sensibilité et la spécificité statistique des biomarqueurs à traduire un effet particulier des radiations ionisantes restent fortement dépendantes du nombre de cas, de la dose et de facteurs comme le facteur individuel, du type de radiations et de la nature de l'exposition. Plus encore, la pertinence scientifique du biomarqueur, c'est-à-dire son rôle et son importance dans la succession des événements moléculaires, cellulaires et tissulaires qui se succèdent après irradiation est un élément incontournable de la robustesse statistique de la prédiction : une recherche fondamentale dynamique des effets biologiques des radiations reste donc la clé dans la quantification du risque radio-induit.

Alors que la plupart des biomarqueurs ont été proposés à partir de données obtenues avec des fortes doses de radiations qui produisent des effets bien documentés, la détectabilité des phénomènes produits par les faibles doses de radiation à l'aide des biomarqueurs actuellement développés demeure faible. En effet, contrairement aux approches épidémiologiques qui peuvent impliquer des dizaines voire des centaines de milliers d'individus exposés, la plupart des biomarqueurs permettent difficilement la prédiction fiable de phénomènes produits pour des doses inférieures à 10-100 mGy sur des dizaines de tumeurs ou des milliers de cellules.

Ainsi, la prédiction des effets de radiosensibilité qui ne sont produits que par de fortes doses est actuellement la mieux documentée, la plus fiable et celle qui mobilise le plus de biomarqueurs. À l'inverse, la radiosusceptibilité des tissus sains et la transformation cellulaire qui génère les tumeurs radio-induites sont issues de phénomènes stochastiques et leur survenue aux faibles doses reste encore rare et mal comprise même si les mécanismes de la radio-carcinogenèse font l'objet de nombreux efforts de recherche : aux faibles doses, le manque de détectabilité des biomarqueurs s'ajoute à la rareté des phénomènes radio-induits responsables d'une cancérisation. Enfin, concernant les effets du vieillissement cellulaire, les mécanismes intrinsèques restent encore méconnus et toute prédiction d'effets de radiodégénérescence en dehors de maladies bien identifiées ne se base pas sur des approches méthodologiques et des données suffisantes.

RÉFÉRENCES

- Achille M, Boukheris H, Caillou B, *et al.* Expression of cell cycle biomarkers and telomere length in papillary thyroid carcinoma: a comparative study between radiation-associated and spontaneous cancers. *Am J Clin Oncol* 2009 ; 32 : 1-8.
- Ainsbury EA, Barnard S, Bright S, *et al.* Ionizing radiation induced cataracts: recent biological and mechanistic developments and perspectives for future research. *Mutat Res Rev* 2016 ; 770 : 238-61.
- Arndt A, Steinestel K, Rump A, *et al.* Anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangements in radiation-related human papillary thyroid carcinoma after the Chernobyl accident. *J Pathol Clin Res* 2018 ; 4 : 175-83.
- Ayouaz A, Raynaud C, Heride C, *et al.* Telomeres: hallmarks of radiosensitivity. *Biochimie* 2008 ; 90 : 60-72.
- Azria D, Ozsahin M, Kramar A, *et al.* Single nucleotide polymorphisms, apoptosis, and the development of severe late adverse effects after radiotherapy. *Clin Cancer Res* 2008 ; 14 : 6284-8.
- Babizhayev MA, Vishnyakova KS, Yegorov YE. Telomere-dependent senescent phenotype of lens epithelial cells as a biological marker of aging and cataractogenesis: the role of oxidative stress intensity and specific mechanism of phospholipid hydroperoxide toxicity in lens and aqueous. *Fundame Clin Pharmacol* 2011 ; 25 : 139-62.
- Badie C, Dziwura S, Raffy C, *et al.* Aberrant CDKN1A transcriptional response associates with abnormal sensitivity to radiation treatment. *Br J Cancer* 2008 ; 98 : 1845-51.
- Baeyens A, Van Den Broecke R, Makar A, *et al.* Chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: influence of age of onset of the disease. *Oncol Rep* 2005 ; 13 : 347-53.
- Baria K, Warren C, Roberts SA, *et al.* Chromosomal radiosensitivity as a marker of predisposition to common cancers? *Br J Cancer* 2001 ; 84 : 892-6.
- Baria K, Warren C, Eden OB, *et al.* Chromosomal radiosensitivity in young cancer patients: possible evidence of genetic predisposition. *Int J Radiat Biol* 2002 ; 78 : 341-6.
- Barnett GC, Coles CE, Elliott RM, *et al.* Independent validation of genes and polymorphisms reported to be associated with radiation toxicity: a prospective analysis study. *Lancet Oncol* 2012 ; 13 : 65-77.
- Barnett GC, Thompson D, Fachal L, *et al.* A genome wide association study (GWAS) providing evidence of an association between common genetic variants and late radiotherapy toxicity. *Radiother Oncol* 2014 ; 111 : 178-85.
- Baumann P, West SC. DNA end-joining catalyzed by human cell-free extracts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95 : 14066-70.
- Behjati S, Gundem G, Wedge DC, *et al.* Mutational signatures of ionizing radiation in second malignancies. *Nat Commun* 2016 ; 7 : 12605.

Bodgi L, Foray N. The nucleo-shuttling of the ATM protein as a basis for a novel theory of radiation response: resolution of the linear-quadratic model. *Int J Radiat Biol* 2016 ; 92 : 117-31.

Bodgi L, Granzotto A, Devic C, *et al.* A single formula to describe radiation-induced protein relocalization: towards a mathematical definition of individual radiosensitivity. *J Theor Biol* 2013 ; 333 : 135-45.

Boerma M, Sridharan V, Mao XW, *et al.* Effects of ionizing radiation on the heart. *Mutat Res Rev* 2016 ; 770 : 319-27.

Boltze C, Riecke A, Ruf CG, *et al.* Sporadic and radiation-associated papillary thyroid cancers can be distinguished using routine immunohistochemistry. *Oncol Rep* 2009 ; 22 : 459-67.

Carney JP. Chromosomal breakage syndromes. *Curr Opin Immunol* 1999 ; 11 : 443-7.

Cedervall B, Wong R, Albright N, *et al.* Methods for the quantification of DNA double-strand breaks determined from the distribution of DNA fragment sizes measured by pulsed-field gel electrophoresis. *Radiat Res* 1995 ; 143 : 8-16.

Chen YR, Zweier JL. Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circ Res* 2014 ; 114 : 524-37.

Cornforth MN, Bedford JS. A quantitative comparison of potentially lethal damage repair and the rejoining of interphase chromosome breaks in low passage normal human fibroblasts. *Radiat Res* 1987 ; 111 : 385-405.

Cox JD, Stetz J, Pajak TF. Toxicity criteria of the Radiation therapy oncology group (RTOG) and the European organization for research and treatment of cancer (EORTC). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995 ; 31 : 1341-6.

Curwen GB, Winther JF, Tawn EJ, *et al.* G(2) chromosomal radiosensitivity in Danish survivors of childhood and adolescent cancer and their offspring. *Br J Cancer* 2005 ; 93 : 1038-45.

Darroudi F, Fomina J, Meijers M, *et al.* Kinetics of the formation of chromosome aberrations in X-irradiated human lymphocytes, using PCC and FISH. *Mutat Res* 1998 ; 404 : 55-65.

Davidson PR, Sherborne AL, Taylor B, *et al.* A pooled mutational analysis identifies ionizing radiation-associated mutational signatures conserved between mouse and human malignancies. *Sci Rep* 2017 ; 7 : 7645.

De Ruyck K, Van Eijkeren M, Claes K, *et al.* TGFbeta1 polymorphisms and late clinical radiosensitivity in patients treated for gynecologic tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006 ; 65 : 1240-8.

De Ruyck K, De Gelder V, Van Eijkeren M, *et al.* Chromosomal radiosensitivity in head and neck cancer patients: evidence for genetic predisposition ? *Br J Cancer* 2008 ; 98 : 1723-38.

D'Errico MP, Grimaldi L, Petruzzelli MF, *et al.* N-terminal pro-B-type natriuretic peptide plasma levels as a potential biomarker for cardiac damage after radiotherapy in patients with left-sided breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012 ; 82 : e239-46.

Detours V, Wattel S, Venet D, *et al.* Absence of a specific radiation signature in post-Chernobyl thyroid cancers. *Br J Cancer* 2005 ; 92 : 1545-52.

Dom G, Tarabichi M, Unger K, *et al.* A gene expression signature distinguishes normal tissues of sporadic and radiation-induced papillary thyroid carcinomas. *Br J Cancer* 2012 ; 107 : 994-1000.

Duker NJ. Chromosome breakage syndromes and cancer. *Am J Med Genet* 2002 ; 115 : 125-9.

Efanov AA, Brenner AV, Bogdanova TI, *et al.* Investigation of the relationship between radiation dose and gene mutations and fusions in post-Chernobyl thyroid cancer. *J Natl Cancer Inst* 2018 ; 110 : 371-8.

Evans HJ. Actions of radiations on human chromosomes. *Phys Med Biol* 1972 ; 17 : 1-13.

Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 2000 ; 455 : 81-95.

Ferlazzo ML, Sonzogni L, Granzotto A, *et al.* Mutations of the Huntington's disease protein impact on the ATM-dependent signaling and repair pathways of the radiation-induced DNA double-strand breaks: corrective effect of statins and bisphosphonates. *Mol Neurobiol* 2014 ; 49 : 1200-11.

Fernet M, Hall J. Predictive markers for normal tissue reactions: fantasy or reality? *Cancer Radiother* 2008 ; 12 : 614-8.

Foray N, Colin C, Bourguignon M. 100 years of individual radiosensitivity: how we have forgotten the evidence. *Radiology* 2012 ; 264 : 627-31.

Foray N, Bourguignon M, Hamada N. Individual response to ionizing radiation. *Mutat Res Rev* 2016 ; 770 : 369-86.

Fugazzola L, Pilotti S, Pinchera A, *et al.* Oncogenic rearrangements of the RET proto-oncogene in papillary thyroid carcinomas from children exposed to the Chernobyl nuclear accident. *Cancer Res* 1995, 55 : 5617-20.

Gatti RA. Localizing the genes for ataxia-telangiectasia: a human model for inherited cancer susceptibility. *Adv Cancer Res* 1991 ; 56 : 77-104.

Gomez DR, Yusuf SW, Munsell MF, *et al.* Prospective exploratory analysis of cardiac biomarkers and electrocardiogram abnormalities in patients receiving thoracic radiation therapy with high-dose heart exposure. *J Thorac Oncol* 2014 ; 9 : 1554-60.

Granzotto A, Joubert A, Viau M, *et al.* Individual response to ionising radiation: what predictive assay(s) to choose? *Cr Acad Sci (Paris)* 2011 ; 334 : 140-57.

Granzotto A, Benadjaoud MA, Vogin G, *et al.* Influence of nucleoshuttling of the ATM protein in the healthy tissues response to radiation therapy: toward a molecular classification of human radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2016 ; 94 : 450-60.

Grote SJ, Joshi GP, Revell SH, *et al.* Observations of radiation-induced chromosome fragment loss in live mammalian cells in culture, and its effect on colony-forming ability. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1981 ; 39 : 395-408.

Hadj-Hamou NS, Ugolin N, Ory C, *et al.* A transcriptome signature distinguished sporadic from postradiotherapy radiation-induced sarcomas. *Carcinogenesis* 2011 ; 32 : 929-34.

Hall J, Jeggo PA, West C, *et al.* Ionizing radiation biomarkers in epidemiological studies – An update. *Mutat Res* 2017 ; 771 : 59-84.

Hamada N, Sato T. Cataractogenesis following high-LET radiation exposure. *Mutat Res Rev* 2016 ; 770 : 262-91.

Handkiewicz-Junak D, Swierniak M, Rusinek D, *et al.* Gene signature of the post-Chernobyl papillary thyroid cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2016 ; 43 : 1267-77.

Hess J, Thomas G, Braselmann H, *et al.* Gain of chromosome band 7q11 in papillary thyroid carcinomas of young patients is associated with exposure to low-dose irradiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011 ; 108 : 9595-600.

HPA. *Human radiosensitivity*. Report RCE 21, 2013.

ICRP. ICRP statement on tissue reactions and early and late effects of radiation in normal tissues and organs-threshold doses for tissue reactions in a radiation protection context. Publication 118. *Ann ICRP* 2012 ; 41 : 1-322.

Iglesias ML, Schmidt A, Ghuzlan AA, *et al.* Radiation exposure and thyroid cancer: a review. *Arch Endocrinol Metab* 2017 ; 61 : 180-7.

Iliakis G. The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. *Bioessays* 1991 ; 13 : 641-8.

Jeggo PA, Lobrich M. DNA double-strand breaks: their cellular and clinical impact? *Oncogene* 2007 ; 26 : 7717-9.

Johnson RT, Rao PN. Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature* 1970 ; 226 : 717-22.

Joubert A, Foray N. Repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in human cells: history, progress and controversies. Landseer BR, ed. In : *New research on DNA repair*. Nova Science Publishers, Inc, 2006.

Joubert A, Zimmerman KM, Bencokova Z, *et al.* DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response: at least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity? *Int J Radiat Biol* 2008 ; 84 : 1-19.

Kabacik S, Ortega-Molina A, Efeyan A, *et al.* A minimally invasive assay for individual assessment of the ATM/CHEK2/p53 pathway activity. *Cell Cycle* 2011 ; 10 : 1152-61.

Kaiser JC, Meckbach R, Eidemüller M, *et al.* Integration of a radiation biomarker into modeling of thyroid carcinogenesis and post-Chernobyl risk assessment. *Carcinogenesis* 2016 ; 37 : 1152-60.

Kerns SL, Ostrer H, Rosenstein BS. Radiogenomics: using genetics to identify cancer patients at risk for development of adverse effects following radiotherapy. *Cancer Discovery* 2014 ; 4 : 155-65.

Kim I, Saito T, Fujii N, *et al.* Site specific oxidation of amino acid residues in rat lens gamma-crystallin induced by low-dose gamma-irradiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2015 ; 466 : 622-8.

Kohn KW. Principles and practice of DNA filter elution. *Pharmacol Ther* 1991 ; 49 : 55-77.

Kraemer KH, Patronas NJ, Schiffmann R, *et al.* Xeroderma pigmentosum, trichothiodystrophy and Cockayne syndrome: a complex genotype-phenotype relationship. *Neuroscience* 2007 ; 145 : 1388-96.

Leonard A, Rueff J, Gerber GB, *et al.* Usefulness and limits of biological dosimetry based on cytogenetic methods. *Radiat Prot Dosimetry* 2005 ; 115 : 448-54.

Little MP. Radiation and circulatory disease. *Mutat Res Rev* 2016 ; 770 : 299-318.

Lobrich M, Rydberg B, Cooper PK. Repair of x-ray-induced DNA double-strand breaks in specific Not I restriction fragments in human fibroblasts: joining of correct and incorrect ends. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 ; 92 : 12050-4.

Maenhaut C, Detours V, Dom G, *et al.* Gene expression profiles for radiation-induced thyroid cancer. *Clin Oncol* 2011 ; 23 : 282-8.

Martins MB, Sabatier L, Ricoul M, *et al.* Specific chromosome instability induced by heavy ions: a step towards transformation of human fibroblasts? *Mutat Res* 1993 ; 285 : 229-37.

Meirmanov S, Nakashima M, Kondo H, *et al.* Correlation of cytoplasmic beta-catenin and cyclin D1 overexpression during thyroid carcinogenesis around Semipalatinsk nuclear test site. *Thyroid* 2003 ; 13 : 537-45.

Meric-Bernstam F, Gutierrez-Barrera AM, Litton J, *et al.* Genotype in BRCA-associated breast cancers. *Breast J* 2013 ; 19 : 87-91.

Meyn MS. High spontaneous intrachromosomal recombination rates in ataxia-telangiectasia. *Science* 1993 ; 260 : 1327-30.

Minamino T, Komuro I. Vascular aging: insights from studies on cellular senescence, stem cell aging, and progeroid syndromes. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2008 ; 5 : 637-48.

National Institutes of Health, National Cancer Institute. *Common terminology criteria for adverse events (CTCAE)*. Version 4.0. May 28, 2009 (v4.03 : June 14, 2010). 2010.

Nelson S, Giver C, Grososky A. Spectrum of X-ray-induced mutations in the hprt gene. *Carcinogenesis* 1994 ; 15 : 495-502.

Olive PL. Impact of the comet assay in radiobiology. *Mutat Res* 2009 ; 681 : 13-23.

Ormerod MG, Lehmann AR. Artefacts arising from the sedimentation of high molecular weight DNA on sucrose gradients. *Biochim Biophys Acta* 1971 ; 247 : 369-72.

Ory C, Ugolin N, Levalois C, *et al.* Gene expression signature discriminates sporadic from post-radiotherapy-induced thyroid tumors. *Endocr Relat Cancer* 2011 ; 18 : 193-206.

Parshad R, Sanford KK, Jones GM. Chromatid damage after G2 phase x-irradiation of cells from cancer-prone individuals implicates deficiency in DNA repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983 ; 80 : 5612-6.

Pereira S, Bodgi L, Duclos M, *et al.* Fast and binary assay for predicting radiosensitivity based on the nucleoshuttling of ATM protein: development, validation and performances. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2018 ; 100 : 353-60.

Pernot E, Hall J, Baatout S, *et al.* Ionizing radiation biomarkers for potential use in epidemiological studies. *Mutat Res* 2012 ; 751 : 258-86.

Port M, Boltze C, Wang Y, *et al.* A radiation-induced gene signature distinguishes post-Chernobyl from sporadic papillary thyroid cancers. *Radiat Res* 2007 ; 168 : 639-49.

Reste J, Zvigule G, Zvagule T, *et al.* Telomere length in Chernobyl accident recovery workers in the late period after the disaster. *J Radiat Res* 2014 ; 55 : 1089-100.

Riches AC, Bryant PE, Steel CM, *et al.* Chromosomal radiosensitivity in G2-phase lymphocytes identifies breast cancer patients with distinctive tumour characteristics. *Br J Cancer* 2001 ; 85 : 1157-61.

Rosenstein BS, West CM, Bentzen SM, *et al.* Radiogenomics: radiobiology enters the era of big data and team science. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2014 ; 89 : 709-13.

Rothkamm K, Lobrich M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ; 100 : 5057-62.

Roti Roti JL, Wright WD. Visualization of DNA loops in nucleoids from HeLa cells: assays for DNA damage repair. *Cytometry* 1987 ; 8 : 461-7.

Roy L, Gregoire E, Durand V, *et al.* Study of the tools available in biological dosimetry to estimate the dose in cases of accidental complex overexposure to ionizing radiation: the Lilo accident. *Int J Radiat Biol* 2006 ; 82 : 39-48.

Sabatier L, Dutrillaux B, Martin MB. Chromosomal instability. *Nature* 1992 ; 357 : 548.

Sanford KK, Parshad R, Gantt R, *et al.* Factors affecting and significance of G2 chromatin radiosensitivity in predisposition to cancer. *Int J Radiat Biol* 1989 ; 55 : 963-81.

Scott D. Chromosomal radiosensitivity and low penetrance predisposition to cancer. *Cytogenet Genome Res* 2004 ; 104 : 365-70.

Selmansberger M, Feuchtinger A, Zurnadzhly L, *et al.* CLIP2 as radiation biomarker in papillary thyroid carcinoma. *Oncogene* 2015a ; 34 : 3917-25.

Selmansberger M, Kaiser JC, Hess J, *et al.* Dose-dependent expression of CLIP2 in post-Chernobyl papillary thyroid carcinomas. *Carcinogenesis* 2015b ; 36 : 748-56.

Shim G, Ricoul M, Hempel WM, *et al.* Crosstalk between telomere maintenance and radiation effects: A key player in the process of radiation-induced carcinogenesis. *Mutat Res Rev Mutat Res* 2014 Jan 31. pii : S1383-5742(14)00002-7.

Shore R. Radiation and cataract risk: Impact of recent epidemiologic studies on ICRP judgments. *Mutat Res Rev* 2016 ; 770 : 231-7.

Skytta T, Tuohinen S, Boman E, *et al.* Troponin T-release associates with cardiac radiation doses during adjuvant left-sided breast cancer radiotherapy. *Radiat Oncol* 2015 ; 10 : 141.

Speit G, Hartmann A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. *Meth Mol Biol* 2005 ; 291 : 85-95.

Sumantran VN. Cellular chemosensitivity assays: an overview. *Meth Mol Biol* 2011 ; 731 : 219-36.

Svensson JP, Stalpers LJ, Esveltdt-Van Lange RE, *et al.* Analysis of gene expression using gene sets discriminates cancer patients with and without late radiation toxicity. *PLoS Med* 2006 ; 3 : e422.

Thacker J. The use of integrating DNA vectors to analyse the molecular defects in ionising radiation-sensitive mutants of mammalian cells including ataxia telangiectasia. *Mutat Res* 1989 ; 220 : 187-204.

Tutt A, Ashworth A. The relationship between the roles of BRCA genes in DNA repair and cancer predisposition. *Trends Mol Med* 2002 ; 8 : 571-6.

Ugolin N, Ory C, Lefevre E, *et al.* Strategy to find molecular signatures in a small series of rare cancers: validation for radiation-induced breast and thyroid tumors. *PLoS One* 2011 ; 6 : e23581.

Vogin G, Bastogne T, Bodgi L, *et al.* The phosphorylated ATM immunofluorescence assay: a high-performance radiosensitivity assay to predict postradiation therapy overreactions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2018 ; 101 : 690-3.

Wilke CM, Braselmann H, Hess J, *et al.* A genomic copy number signature predicts radiation exposure in post-Chernobyl breast cancer. *Int J Cancer* 2018 ; 143 : 1505-15.

Willems P, Claes K, Baeyens A, *et al.* Polymorphisms in nonhomologous end-joining genes associated with breast cancer risk and chromosomal radiosensitivity. *Genes Chrom Cancer* 2008 ; 47 : 137-48.

Wondergem J, Strootman EG, Frolich M, *et al.* Circulating atrial natriuretic peptide plasma levels as a marker for cardiac damage after radiotherapy. *Radiother Oncol* 2001 ; 58 : 295-301.

Zschenker O, Raabe A, Boeckelmann IK, *et al.* Association of single nucleotide polymorphisms in ATM, GSTP1, SOD2, TGFB1, XPD and XRCC1 with clinical and cellular radiosensitivity. *Radiother Oncol* 2010 ; 97 : 26-32.