



**HAL**  
open science

## Outils pour la prédiction de la réponse tumorale et des tissus sains en oncologie radiothérapie

O. Riou, C. Bourgier, M. Brengues, N. Bonnefoi, H.-A. Michaud, F. Castan, S. Gourgou, R. Draghici, M.-P. Farcy-Jacquet, F. Bons, et al.

► **To cite this version:**

O. Riou, C. Bourgier, M. Brengues, N. Bonnefoi, H.-A. Michaud, et al.. Outils pour la prédiction de la réponse tumorale et des tissus sains en oncologie radiothérapie. *Cancer/Radiothérapie*, 2019, 23, pp.666 - 673. 10.1016/j.canrad.2019.07.152 . hal-03487486

**HAL Id: hal-03487486**

**<https://hal.science/hal-03487486>**

Submitted on 20 Jul 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial 4.0 International License

## **Outils pour la prédiction de la réponse tumorale et des tissus sains en oncologie radiothérapie**

### **Predictive assays for responses of tumors and normal tissues in radiation oncology**

O. Riou<sup>a,b</sup>, C. Bourcier<sup>a,b</sup>, M. Brengues<sup>a</sup>, N. Bonnefoi<sup>a</sup>, H-A Michaud<sup>a</sup>, F. Castan<sup>c</sup>, S. Gourgou<sup>c</sup>, R. Draghici<sup>b</sup>, M-P Farcy-Jacquet<sup>d</sup>, F. Bons<sup>d</sup>, P. Fenoglietto<sup>b</sup>, M. Ozsahin<sup>c</sup>, D. Azria<sup>a,b,d\*</sup>

<sup>a</sup>*IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, INSERM U1194, Univ Montpellier, Avenue des Apothicaires, 34298 Montpellier cedex 05, France*

<sup>b</sup>*Fédération Universitaire d'Oncologie Radiothérapie, ICM, Institut régional du Cancer Montpellier, Rue croix verte, 34298 Montpellier cedex 05, France*

<sup>c</sup>*Unité de Biométrie, ICM, Institut régional du Cancer Montpellier, Rue croix verte, 34298 Montpellier cedex 05, France*

<sup>d</sup>*Fédération Universitaire d'Oncologie Radiothérapie, Institut de Cancérologie du Gard, CHU de Nîmes, Rue Henri Pujol, 30000 Nîmes, France*

<sup>e</sup>*Service de Radio-oncologie, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Rue du Bugnon 46, 1011 Lausanne, Suisse*

\*Correspondance

David Azria, Fédération Universitaire d'Oncologie Radiothérapie Montpellier-Nîmes, Institut du Cancer Montpellier (ICM), Rue croix verte, 34298 Montpellier, cedex 5, France.

Téléphone: + 33 4 67 61 31 32, Fax: + 33 4 67 61 31 35,

Adresse e-mail : david.azria@icm.unicancer.fr (David Azria)

**Titre court :** Radiothérapie personnalisée et cancer du sein

**Remerciements :** Les auteurs remercient le SIRIC Montpellier Cancer pour leur soutien financier et logistique du programme « radiobiologie » : SIRIC Montpellier Cancer Grant

INCa\_Inserm\_DGOS\_12553.

**Résumé**

Le succès de la radiothérapie dépend principalement de la dose totale délivrée de manière homogène dans la tumeur. La sensibilité de la tumeur à la radiothérapie peut être très variable selon la localisation, le type histologique, les paramètres génétiques somatiques et la capacité au recrutement immunologique. De plus, la délivrance de cette dose est limitée par la tolérance des tissus sains dans le volume irradié. Dans une même population traitée de manière homogène sur le plan technique et évaluée par la même équipe, il est clair qu'il existe une radiosensibilité différente des tissus sains, notamment en termes de toxicité tardive, le plus souvent irréversible. Cette revue détaille les différentes avancées en radiobiologie clinique sur les outils disponibles pour la prédire la réponse tumorale mais également les effets secondaires tardifs après radiothérapie.

**Mots clés :** test radiosensibilité ; tumeur ; tissu sain ; radiothérapie

**Abstract**

The impact of curative radiotherapy depends mainly on the total dose delivered homogeneously in the target volume. Tumor sensitivity to radiotherapy may be particularly inconstant depending on location, histology, somatic genetic parameters and the capacity of the immune system to infiltrate the tumor. In addition, the dose delivered to the surrounding healthy tissues may reduce the therapeutic ratio of many radiation treatments. In a same population treated in one center with the same technique, it appears that individual radiosensitivity clearly exists, namely in terms of late side-effects that are in principle non reversible. This review details the different radiobiological approaches that have been developed to better predict the tumor response but also the radiation-induced late effects.

**Keywords:** predictive assay ; tumor ; normal tissue; radiotherapy

## Introduction

Avec près de 200 000 patients traités en 2016 en France, la radiothérapie est aujourd'hui devenue un traitement incontournable de l'arsenal thérapeutique du cancer. Les données épidémiologiques montrent que près de 65% des personnes atteintes par un cancer subiront au moins une séance de radiothérapie au cours de leur traitement. L'efficacité de la radiothérapie dépend en grande partie de la dose délivrée à la tumeur : plus la dose sera importante, plus le contrôle tumoral est maximal et les chances de contrôle de la maladie augmentées. Malheureusement, la sensibilité de la tumeur à la radiothérapie peut être très variable [1] selon l'hétérogénéité tumorale, la localisation, le type histologique, les paramètres génétiques somatiques et la capacité au recrutement immunologique. De plus, la dose d'irradiation ne peut pas dépasser un seuil déterminé de tolérance au risque d'entraîner d'importants effets secondaires. Depuis maintenant plus d'un siècle, les différents travaux en radiobiologie ont montré que cette radiosensibilité des tissus sains était individuelle et que chacun possédait son propre seuil de tolérance aux rayonnements ionisants [2].

En pratique, cette notion majeure de la radiobiologie a cependant été marginalisée. Afin d'améliorer l'efficacité de la radiothérapie, l'accent a été mis sur les progrès technologiques considérables qui permettent désormais de délivrer des irradiations de plus en plus ciblées, au plus près de la tumeur tout en épargnant le tissu sain environnant. Les protocoles actuels sont quant à eux standardisés et les doses sont calculées à partir de la population générale afin de réduire à un faible pourcentage le nombre de complications secondaires. Si ces protocoles permettent donc de réduire au maximum les effets secondaires tardifs de la radiothérapie, ils impliquent également qu'une majorité de patients reçoivent une dose en deçà de leur seuil de tolérance. Avec l'avènement de la médecine personnalisée, un des enjeux actuels de la radiobiologie clinique est donc d'arriver à prédire la radiosensibilité individuelle de chaque patient afin de pouvoir délivrer un traitement ciblé grâce à des protocoles d'irradiation « sur-mesure » qui amélioreraient ainsi l'efficacité de la radiothérapie et les chances de guérison.

Depuis les premières études sur les fibroblastes aux dernières révolutions technologiques de criblage haut débit, nous développons dans cette revue comment les progrès technologiques et l'amélioration de nos connaissances nous permettent de croire à l'aboutissement d'un tel test qui changerait alors radicalement la pratique courante de la radiothérapie. Nous détaillons également l'adaptation permanente de ces recherches aux impératifs technologiques et logistiques qu'impose un test clinique, en améliorant notamment leur manutention, leur coût, leur rapidité ou bien encore leur reproductibilité.

### **Facteurs prédictifs de réponse tumorale à la radiothérapie : radiosensibilité somatique**

Malgré un intérêt grandissant et de nombreuses données pour la recherche de biomarqueurs prédictifs de la radiothérapie, aucun n'est actuellement disponible en routine clinique. Il existe en effet peu de données prospectives, et aucune étude évaluant l'utilité clinique de l'utilisation prospective de ces biomarqueurs [2].

Les marqueurs prédictifs dérivés des paramètres d'imageries ne seront pas abordés dans cette revue, de même que les facteurs influençant la réponse à des modificateurs de l'hypoxie tumorale (car ils représentent plus la prédiction à l'efficacité de ces traitement concomitants à la radiothérapie que la prédiction de l'efficacité de la radiothérapie elle-même).

#### *Confusion entre facteurs pronostics et prédictifs*

Un facteur pronostique est un paramètre qui va prédire un évènement d'intérêt futur (la toxicité, la progression, le décès) de façon indépendante au traitement du patient. Ce paramètre est mesuré à l'origine (diagnostic, randomisation, ou toute date d'origine identifiant le début du suivi).

Un facteur prédictif d'une réponse à un traitement est un cas particulier de facteur pronostique. C'est un paramètre qui va modifier l'effet d'un traitement sur un évènement d'intérêt futur. Un facteur pronostique n'est pas systématiquement prédictif de la réponse au traitement alors qu'un facteur prédictif est pronostique dans au moins un des bras de traitement. Ce type de facteur met en évidence une interaction soit quantitative (effet du traitement est de taille différente mais dans le même sens)

soit qualitative (effet du traitement est opposé) selon les modalités du paramètre [3-6].

### *Signatures moléculaires ou géniques prédictives*

Certaines signatures ont été réalisées à partir de données de patients soumis à une séquence thérapeutique incluant plusieurs modalités (chirurgie, radiothérapie ou chimio-radiothérapie, chimiothérapie). Ces signatures ne peuvent être appliquées que pour prédire l'efficacité de l'ensemble de la séquence de traitement et peut difficilement être utilisée pour anticiper l'efficacité de la radiothérapie de manière indépendante [7, 8].

#### - Radiosensitivity Index (RSI) et Genomic adjusted radiation dose (GARD)

Il s'agit sans aucun doute des biomarqueurs prédictifs de réponse tumorale dont le développement est le plus avancé. Le *radiosensitivity index* (RSI) est le fruit de recherche initiales *in vitro* puis *in vivo* publiées en 2005, avant une évaluation clinique progressive au cours du temps [9]. Il s'agit d'une signature moléculaire basée sur 10 gènes d'intérêt (Androgen receptor, c-Jun, STAT1, PKC, p65, c-Abl, SUMO-1, CDK1, HDAC1 et IRF1). L'*index* est individualisé à partir des biopsies initiales ou du tissu tumoral « frais » congelés avant radiothérapie. L'ARN tumoral est extrait, amplifié, marqué, et hybridé sur des puces à ADN. Une formule mathématique est appliquée prenant en compte le résultat pour chaque gène au sein du modèle. L'index est élevé en cas de radiorésistance de la tumeur. Les premières études cliniques ont testé la signature sur une série de patients atteints de cancers œsophagiens, ORL et rectaux [10]. Progressivement, le RSI a été validé sur des séries rétrospectives de qualité, ou de manière rétrospectives sur des séries de patients issus d'essais prospectifs ayant reçu ou non de la radiothérapie.

Afin d'augmenter la puissance prédictive de la signature, le RSI a parfois été combiné à des facteurs cliniques ou au sein de scores de prédiction [11, 12]. Le plus abouti, le *Genomic adjusted radiation dose* (GARD), associe le RSI et le modèle linéaire-quadratique, calculé à partir de l'analyse rétrospective des tissus collectés lors de l'étude clinique prospective observationnelle « total cancer care ». Le modèle a ensuite été validé dans cinq cohortes prospectives indépendantes [13].

Le RSI et ses dérivés ont été testés dans les tumeurs oesophagiennes, ORL, rectales, pancréatiques, mammaires, coliques et ses métastases, ainsi que dans le glioblastome et les métastases cérébrales [9, 11, 12, 14-18].

- Prolaris, Decipher et PORTOS

Il s'agit de signatures développées pour prédire l'efficacité de la radiothérapie de loge prostatique en situation post-opératoire (adjuvante ou rattrapage) ou de la radiothérapie prostatique exclusive.

Le CCP score (Cell Cycle Proliferation) ou Prolaris a testé un panel de 31 gènes développé sur une série de patients traités par prostatectomie radicale ou résection trans-urétrale de prostate, et semblait corrélé avec pronostic des cancers [19]. Il a été testé rétrospectivement chez des patients traités par irradiation exclusive et semblait corrélé avec la rechute biochimique. Malgré les conclusions des auteurs, il s'agit vraisemblablement d'un score pronostique [20].

Le *Decipher Genomic Classifier* a été testé sur une série rétrospective multicentrique, et a démontré un intérêt dans la prédiction de la survenue de métastases dans ce contexte [21]. Néanmoins, cette signature semble avant tout pronostique.

PORTOS (Post-Operative Radiation Therapy Outcomes Score) est une signature moléculaire basée sur 24 gènes. Elle a été développée rétrospective à partir de cinq séries publiées (une série pour le *design* et quatre pour la validation du score). Le score semble montrer de manière indépendante un effet prédictif de la radiothérapie pour la prévention de la survenue de métastases en cas de score élevé. Il s'agit de la première signature moléculaire capable de prédire la réponse à la radiothérapie dans le cancer de la prostate [22].

- Autres signatures

La plupart des autres signatures sont basées sur des recherches « in silico », réalisées sur des bases de données accessibles librement en ligne, issues de programme de séquençage géniques à grande échelle, pour lesquelles des données de patients sont accessibles. La plus connue et la plus utilisée est la base de données TCGA (The Cancer Genome Atlas program) [23].

Si cette méthodologie permet d'initier facilement et rapidement des hypothèses de travail, elle n'est pas suffisante pour donner une robustesse aux résultats présentés. Beaucoup de ces signatures n'ont été évaluées que dans un seul modèle tumoral, fréquemment dans un contexte de chimioradiothérapie concomitante, et les résultats ne sont pas extrapolables à d'autres cancers ou en cas de traitements concomitants différents.

#### *Biomarqueurs liés aux gènes ou molécules de réparation de l'ADN*

Le mode d'action principal de la radiothérapie étant la création de lésions au sein de l'ADN tumoral, il n'est pas étonnant que les molécules de réparations de l'ADN soient étudiées en tant que biomarqueurs prédictifs potentiels de réponse au traitement. Outre leur présence dans certaines des signatures moléculaires citées précédemment, elles ont également été étudiées de manière indépendante. La cible la plus intéressante semble être la protéine MRE 11, qui fait partie du complexe MRN avec RAD50 et NBS1. MRN est un capteur des cassures double-brin de l'ADN, il recrute ATM et est impliqué dans la résection finale pendant la réparation de ces cassures. MRE11 semble être prédictif de l'efficacité de la radiothérapie dans les cancers de vessie, du sein et du rectum. Néanmoins, son niveau d'expression n'est pas toujours corrélé identiquement avec le pronostic suivant le type de tumeurs. En effet, une surexpression est pronostic favorable dans les cancers de vessie, mais de mauvais pronostic dans les cancers du rectum [24], alors que la réduction de l'expression du complexe MRN est pronostic défavorable dans le cancer du sein [25]. Enfin un polymorphisme (SNP) particulier de MRE11 semble être spécifiquement associé à une mauvaise réponse à la radiothérapie dans le cancer de vessie, mais pas en cas de cystectomie [26].

#### *Prédiction par les biomarqueurs de type microARN (miRNA)*

Un nombre conséquent de publication rapporte la valeur prédictive de certains miRNA évalués de manière indépendante ou combiné au sein d'un panel. Cependant, aucun n'est retrouvé de manière constante au sein des études et des données complémentaires pour chacun sont nécessaires avant de

pouvoir conclure sur leur intérêt ou non. Certains ont évalué la prédiction d'une séquence thérapeutique incluant la radiothérapie mais pas la radiothérapie seule [27].

#### *HPV comme biomarqueur prédictif*

HPV (papilloma virus humain) est un virus oncogénique impliqué dans la survenue des carcinomes épidermoïdes du col utérin, du canal anal et ORL. Comme la prévalence de l'infection HPV est très élevée pour les cancers du col et du canal anal, HPV en tant que facteur prédictif de réponse n'a pas été étudié dans ces types de cancer, mais a fait l'objet de nombreuses recherches dans les cancers ORL. Néanmoins, une interrogation subsiste sur la nature prédictive ou pronostique seule de ce marqueur après radiothérapie [28]. En effet, si la nature pronostique ne fait aucun doute, son impact en cas d'utilisation de fractionnements intensifiés de radiothérapie n'a pas été montré [29]. Cependant, il a été clairement montré que l'infection par HPV influence la radiosensibilité tumorale dans les cancers ORL [30]. Si le statut initial n'est peut-être pas suffisant pour en faire un marqueur prédictif, l'évolutivité de l'infection HPV sous chimioradiothérapie pourrait au contraire être prédictive du contrôle de la maladie chez les patient infecté par l'HPV [31].

#### *Biomarqueurs prédictifs immunologiques*

La tumeur présente une architecture complexe dans lequel le système immunitaire joue un rôle primordial. La radiothérapie est un agent localement immunostimulant par le relargage local d'antigènes tumoraux. De plus, lors de son action sur la cellule tumorale, la radiothérapie met en jeu tous les acteurs de la mort cellulaire immunogénique [32]. La recherche de biomarqueurs immunologiques de réponse à la radiothérapie semble donc logique. On peut globalement distinguer les facteurs liés à l'immunité périphérique et les biomarqueurs liés au microenvironnement tumoral immunologique.

Dans le sang périphérique, la valeur pronostique du ratio polynucléaires neutrophiles sur lymphocytes a été établie [33]. Néanmoins, il ne semble pas que ce ratio soit de nature prédictive. Dans le cancer pulmonaire, il a été montré la valeur prédictive des taux sanguins de certains sous types

de lymphocytes T (T régulateurs dans une étude, cellules T naïves et mémoires dans une autre) chez les patients recevant une radiothérapie [34]. L'étude de la fonctionnalité des cellules circulantes pourraient mieux représenter leur capacité effective et prédire plus efficacement la réponse au traitement [35].

De nombreuses études ont regardé la valeur prédictive de réponse à la radiothérapie des lymphocytes T infiltrant les tumeurs (TiLs). Il faut noter une absence de standardisation des mesures, des méthodes d'évaluation et des cut-off différents suivants les études, et la nécessité d'avoir accès à la tumeur locale dans tous les cas.

Le plus grand nombre de données a été établi sur l'adénocarcinome rectal. La densité et les sous types de TiLs sur les biopsies pré thérapeutiques ont été corrélés rétrospectivement avec la réponse à la radiothérapie (réponse histologique) et/ou au devenir des patients (survie) [36]. Ces résultats méritent confirmation sur des études prospectives de plus grande ampleur et avec une standardisation des paramètres étudiés.

## **Facteurs prédictifs de réponse des tissus sains à la radiothérapie : radiosensibilité individuelle**

### *Le fibroblaste, premier sujet d'étude*

Grâce aux courbes de survie élaborées *in vitro* par Puck et Marcus [37] et *in vivo* par Hewitt et Wilson [38], les premières études ont utilisé la représentation graphique de la survie à l'irradiation de cellules données en fonction de la dose absorbée décrivant ainsi leur capacité à se multiplier et à donner naissance à un clone sous irradiation. Grâce à cette méthode, Taylor et al. ont montré que, sous irradiation, des fibroblastes de la peau de patients sains ont une meilleure survie que des fibroblastes de patients atteints d'ataxie télangiectasie, syndrome dont un des principal symptôme est une hypersensibilité aiguë aux rayonnements ionisants [39]. Cette étude a démontré pour la première fois une corrélation entre la radiosensibilité cellulaire et la radiotoxicité des tissus sains, et a confirmé l'existence d'une variabilité individuelle face aux rayonnements ionisants. Par la suite et en rappelant ce concept, les premiers tests élaborés se sont basés sur un test de clonogénicité des fibroblastes. Chez des patients traités par radiothérapie, Burnet et al. [40] ont montré qu'il existait une corrélation entre la survie de fibroblastes irradiés *in vitro* et l'apparition de réactions secondaires des tissus sains, essentiellement précoces. Face à ces résultats encourageants, l'idée d'un test prédictif de radiotoxicité des tissus sains a été suivie d'un engouement particulier, notamment parmi certains cliniciens confrontés au quotidien à ces événements indésirables. Cependant, le développement de ces tests a été très rapidement limité par leur utilisation en routine clinique : une biopsie cutanée était nécessaire pour avoir accès aux fibroblastes, la culture cellulaire et le test de clonogénicité demandaient des préparations longues, l'expérience nécessitait un personnel qualifié et donc un coût élevé. Mais surtout, les résultats initiaux n'ont pas été confirmés sur de plus grandes cohortes de patients quelques années plus tard [41]. Les conclusions des premières études n'ont en réalité pas testé les mêmes hypothèses et ne peuvent donc être comparées. Afin de trouver une alternative au test de clonogénicité, d'autres approches ont alors été étudiées, comme la mesure de l'induction et des réparations des dommages ADN causés par l'irradiation (test des comètes) [42] ou le test de formation des

micronoyaux [43] qui nécessitaient moins de temps et moins de cellules. Cependant, ces premiers résultats encourageants n'ont pu être confirmés par la suite lors d'études prospectives sur de plus larges cohortes de patients [44].

#### *Le tissu sanguin pour des tests rapides tournés vers la clinique*

Afin de pallier les problèmes que posent les tests réalisés sur des fibroblastes, un grand nombre d'études se sont alors intéressées au tissu sanguin. En effet, le sang est un matériel biologique facilement accessible, disponible en grande quantité, et qui demande généralement une manutention moins importante que d'autres fluides biologiques ou prélèvements tissulaires. Les premiers travaux se sont principalement basés sur l'étude du lymphocyte, cellule sanguine connue pour son importante radiosensibilité. Si certains tests lymphocytaires se basent toujours sur les tests de clonogénicité [45], d'autres techniques ont été développées. Une étude a montré l'existence d'une corrélation significative entre la fréquence de formation de micronoyaux dans des lymphocytes irradiés *in vitro* à 4 Gy et la sévérité des réactions secondaires précoces et tardives chez des patientes traitées par irradiation pour un cancer du col de l'utérus [46]. Cependant, ces résultats n'ont pu être confirmés par d'autres équipes et les contradictions continuent d'alimenter les débats [47]. Le test des comètes, réalisé sur des lymphocytes, a également montré son efficacité pour la prédiction des réactions précoces à la radiothérapie. Cependant là aussi, des études ont apporté des résultats contradictoires : si ces dernières montrent que le test des comètes est capable d'identifier les patients avec une réponse cellulaire anormale sous irradiation, le lien entre défaut de réparation et radiotoxicité est moins évident [48]. Comme pour les études préliminaires sur les fibroblastes, il est difficile de comparer ces études entre elles et les résultats contradictoires peuvent facilement s'expliquer par la disparité des méthodes utilisées, tant dans les protocoles des tests utilisés que dans le choix des cohortes de patients et des critères d'évaluation de la toxicité.

A la fin des années 90, Ozsahin *et al.* ont proposé pour la première fois un nouveau test basé cette fois sur l'apoptose lymphocytaire [49]. L'apoptose est une forme de mort cellulaire radio-induite dont l'importance dépend plus du type cellulaire que de la dose délivrée. Elle est, par exemple,

particulièrement importante dans les tissus lymphoïdes et représente la principale forme de cytotoxicité des lymphocytes. Cette réponse est rapide (6 à 72h après l'irradiation) et peut facilement être mesurée par une diminution de fluorescence de l'ADN nucléaire, détectable en cytométrie en flux [50]. Le principe de ce test est simple : deux tubes de sang sont prélevés avant le traitement et un d'entre eux est irradié ex-vivo à 8 Gy pendant que l'autre sert de contrôle (0 Gy); 48h plus tard, le taux d'apoptose radio-induite des lymphocytes CD8 (TALRI), plus spécifique que les CD4, est calculé par rapport à leur taux d'apoptose basal (contrôle). Deux études prospectives respectivement sur 399 patients [51] et 150 patients [52] ont ainsi montré qu'un TALRI bas est significativement corrélé au pourcentage de toxicités tardives de grade supérieur à 2 et qu'un TALRI élevé permet de prédire avec 99% d'exactitude l'absence de risque majoré de séquelles après radiothérapie curative (excellente sensibilité). En 2015, l'étude multicentrique française a confirmé ces résultats et a validé le rôle prédictif du RILA sur la toxicité cutanée de la radiothérapie adjuvante du sein [53]. Dernièrement, ces résultats ont pu être confirmés de manière indépendante, sur différentes populations, par d'autres équipes et sur d'autres types de cancers [54, 55]. Les derniers résultats de l'étude européenne REQUITE sur plus de 1300 patients ont été récemment présentés au congrès de l'ESTRO (European Society for Radiotherapy and Oncology) de 2019 et sont très prometteurs en termes de confirmation de la valeur prédictive du RILA sur la toxicité tardive radio-induite après irradiation du sein et de la prostate [56].

En permettant la réalisation de tests prédictifs rapides et peu invasifs, le tissu sanguin possède un intérêt clinique important. Néanmoins, si l'ensemble des patients ayant eu des réactions secondaires tardives ont un TALRI faible, sa réciproque n'est pas vraie (spécificité de 19%) et un certain nombre de patients qui montrent un TALRI faible ne développeront pas de toxicités tardives. Sa valeur prédictive positive nécessite un complément de travaux de recherche pour une utilisation clinique fiable. Grâce à sa rapidité et sa simplicité, un tel examen peut d'ores et déjà aider au choix décisionnel thérapeutique et un programme (forfait d'innovation) de changement des pratiques a été déposé à la Haute Autorité de Santé (HAS).

*L'arrivée du criblage haut débit donne de nouvelles perspectives*

Grâce à l'amélioration de la technologie, la radiobiologie a utilisé les nouvelles méthodes de criblage haut débit, notamment en génomique. Depuis la découverte de la mutation homozygote du gène ATM et de sa corrélation à une hypersensibilité aux rayonnements ionisants, il est clairement établi que des gènes spécifiques peuvent influencer la radiosensibilité des tissus sains. Toutefois, le modèle génétique extrêmement complexe qui régit ce phénomène n'est pas connu et peut avoir de nombreuses origines différentes. Il peut aller d'une simple mutation, rare et unique, ayant un effet important (comme dans le cas de la mutation ATM) à une combinaison de plusieurs variants génétiques qui confèrent alors ensemble une radiosensibilité (ou radiorésistance) accrue. Dans la réalité, il est même fort probable que ce soit ce dernier mécanisme qui soit le plus courant et que toute une gamme d'allèles de différentes fréquences et de différentes tailles soit impliquée dans ces phénomènes. Cette complexité et ces multiples interactions rendent difficiles l'identification d'un gène ou d'une signature génétique prédictive de la radiotoxicité. Cependant, grâce au criblage haut débit, de nombreuses études génétiques d'association cas-témoins peuvent désormais comparer à grande échelle les profils génétiques des personnes hypersensibles aux rayonnements des profils génétiques de personnes radiorésistantes, renforçant ainsi la pertinence des résultats désormais établis sur un nombre important de patients. Plusieurs formes de variations génétiques peuvent être détectées lors de ces études. La majorité d'entre elles sont la recherche de polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP, de l'anglais *Single Nucleotide Polymorphism*) mais peuvent également concerner la recherche de polymorphismes de séquence microsatellite, la mesure de la variabilité du nombre de copies d'un gène ou d'une partie d'un gène ou encore la recherche de modifications épigénétiques comme la méthylation des cytosines des îlots CpG ou la modification des histones.

Les études radiogénomiques publiées à ce jour ont pour la plupart adopté l'approche gène-candidat ; c'est-à-dire que la voie biologique impliquée dans la radiotoxicité étudiée est dans un premier temps identifiée et que seuls les variants des gènes codant pour les protéines de cette voie sont recherchés. Ces dernières ont donc naturellement abouti à l'identification de variants génétiques

impliqués dans de nombreux processus cellulaires de réponse aux rayonnements ionisants [57]. Les variants des gènes codant pour des protéines impliquées dans les voies de réparation de l'ADN sont les plus nombreux à avoir été identifiés. Ces dernières appartiennent à l'ensemble des grands systèmes de réparation et concernent la réparation des principaux dommages radio-induits: la réparation des cassures simple brin (APEX1, XRCC1) par des mécanismes tels que la réparation par excision de bases et la réparation des cassures double brins (ATM, BRCA1, BRCA2, XRCC3, XRCC5) par des mécanismes tels que la jonction non homologue des brins atteints ou la recombinaison homologue. D'autres variants concernent également le stress oxydatif (GSTP1, MPO, SOD2) ou encore la réponse inflammatoire (TGFβ1, Transforming growth factor beta) [58]. Malheureusement, plusieurs méta-analyses n'ont pu confirmer la corrélation des SNPs considérés individuellement à la toxicité radio-induite [59]. Une explication possible peut venir de l'approche gène-candidat de ces études. Cette approche nécessite que la biologie et le génotype de la maladie dans laquelle le gène étudié est impliqué soient suffisamment bien compris. Or, les fonctions précises de la majorité des gènes identifiés par le *Human Genome Project* sont encore inconnues et les mécanismes moléculaires des pathologies radio-induites des tissus sains sont complexes et ne sont pas encore totalement maîtrisées.

Avec les développements récents du génotypage à très haut débit, cette limitation peut être évitée grâce aux études d'association du génome en entier (GWAS, de l'anglais *genome-wide association studies*). Les GWAS permettent en effet de séquencer plus d'un million de SNPs en une seule expérimentation qui, ensemble, représentent toutes les variations d'un génome. Les GWAS permettent ainsi d'identifier des gènes associés à diverses pathologies sans qu'aucune hypothèse physiopathologique ne soit nécessaire. La première GWAS à avoir tenté d'identifier des SNPs associés aux effets indésirables de la radiothérapie a permis de révéler le SNP rs2268363 localisé dans le gène *FSHR* (de l'anglais *Follicle-Stimulating Hormone Receptor*) et qui est significativement associé à un dysfonctionnement érectile chez des patients atteints par un cancer de la prostate et traités par radiothérapie externe [60]. Il est cependant important de souligner que les GWAS ont une interprétation exclusive des résultats : soit l'individu est porteur de la pathologie soit il ne l'est pas. Dans le cadre d'une évaluation de la toxicité radio-induite, le problème est plus difficile. Les effets

biologiques des rayonnements sont complexes et difficilement assimilables à un classement dichotomique. Ils peuvent apparaître à des temps différents (effets précoces ou tardifs), les pathologies associées peuvent être variées et classées différemment notamment selon le degré de toxicité.

La diversité de ces phénotypes implique donc des combinaisons rares de variations génétiques nombreuses et variées, et l'analyse des données recueillies ne peuvent alors être pertinentes que pour un très grand nombre d'échantillons. Il est donc admis qu'une seule institution ne peut réaliser elle-même une GWAS avec un résultat suffisamment significatif et que seul un consortium international, représentant plusieurs centres, peut fournir un cadre adéquat pour les études de validation des futurs GWAS [61].

Dans une moindre mesure, le criblage haut débit a également permis l'étude du transcriptome. Ainsi, dès 2006, grâce à l'utilisation de puces à ADN complémentaire (ADNc), une étude a montré dans des lymphocytes de patients traités par radiothérapie pour un cancer de la prostate, une corrélation entre la surexpression de 19 ARN messagers, dont les gènes sont principalement impliqués dans la réparation des cassures double brins de l'ADN et une radiorésistance des tissus sains [62]. Un an plus tard, la même équipe a montré que la surexpression de l'ARNm du gène XPC, gène également impliqué dans les réparations des dommages à l'ADN, est associée à un risque plus élevé de réactions secondaires à la radiothérapie chez des patients atteints d'un cancer de la prostate [63]. Plus récemment, une étude a tenté d'identifier une signature d'ARNm de lymphocytes de patients atteints de cancers du sein ou ORL et ayant développé des réactions secondaires à la radiothérapie [64]. Si à l'état basal aucun gène n'est capable de différencier significativement les deux groupes, les auteurs ont montré qu'après une irradiation *in vitro* de 5 Gy, 153 gènes avaient leur expression modifiée et 67 d'entre eux pouvaient prédire la radiosensibilité du tissu normal par le niveau de leur réponse transcriptionnelle. La majorité de ces gènes sont impliqués dans la régulation de l'apoptose ou du cycle cellulaire. Par ailleurs, cette équipe a également appliqué cette même méthode sur des lymphocytes transformés par le virus Epstein-Barr sans pouvoir différencier les deux groupes de patients. Cela permet de mettre en garde sur l'utilisation de lignées transformées, qui, si elles sont un bon moyen d'étude, facilement accessibles, ne reflètent pas systématiquement la réalité physiologique.

Le fait que les rayonnements ionisants induisent la dérégulation d'un grand nombre de gènes suggère également que les micro-ARN (miARN), qui régulent l'expression d'un grand nombre de gènes cibles, peuvent également être impliqués dans la réponse radio-induite. Si à l'heure actuelle, il n'existe pas encore d'étude sur l'identification et l'évaluation d'une signature de miARN chez des patients traités par radiothérapie, quelques études portant sur des lignées cellulaires ont pu mettre en évidence un rôle de certains miARN dans les mécanismes de réponse à l'irradiation des cellules normales [65]. Si ces études sont prometteuses, il faut bien garder à l'esprit que, contrairement au génome, le transcriptome est variable et diffère selon le type cellulaire, le temps et les conditions données. A ce titre, les effecteurs finaux de la réponse cellulaires étant les protéines, l'étude de protéome pourrait être bien plus prometteuse, une modification radio-induite de l'expression du transcriptome n'étant pas nécessairement corrélée à la véritable réponse protéique [66].

#### *L'essor de la protéomique*

De manière identique à l'approche gène-candidat, de nombreuses études protéomiques se sont basées sur une approche protéine-candidate pour identifier de nouveaux marqueurs protéiques de la toxicité radio-induite. La réponse cellulaire à l'irradiation est variée et de nombreuses voies et processus cellulaires sont activés : mécanismes de réparations de l'ADN, régulation de l'homéostasie cellulaire, défense face au stress oxydatif, activation du système cicatriciel, etc.

La majorité des protéines impliquées dans ces mécanismes sont des protéines sécrétées. Les nombreux avantages qui résultent de cette particularité (quantité et facilité de prélèvement en première intention) font de ces protéines des candidats de choix dans la recherche de marqueurs cliniques. Parmi les protéines sécrétées jouant un rôle prépondérant dans la réponse tissulaire radio-induite, les cytokines sont majoritaires. Ainsi, une surexpression du TGF $\beta$ 1, principale cytokine impliquée dans la fibrogenèse, a pu être mise en évidence dans le plasma de patients traités par radiothérapie pour un cancer du poumon ou du sein et ayant développé des effets secondaires au traitement [67, 68]. D'autres cytokines sont également à l'étude comme les interleukines, la KL-6 et les protéines du surfactant. Si l'ensemble de ces études ont montré un pouvoir prédictif potentiel de ces protéines,

aucune d'entre elles n'a pu obtenir de résultats suffisamment significatifs pour une utilisation de ces marqueurs en clinique. Pour tenter de pallier ce problème, une étude a tenté de combiner plusieurs protéines et a travaillé sur un panel de 17 cytokines [69]. Les résultats ont montré que seul le niveau d'expression de l'interleukine-8 avant le début du traitement se révélait être suffisamment significatif pour discriminer des patients atteints d'une toxicité pulmonaire de ceux n'en n'ayant pas développé. Aucune combinaison de plusieurs cytokines ne s'est avérée discriminante. Ainsi, la concentration plasmatique de la citrulline a été évaluée dans la prédiction de la toxicité intestinale chez des patients traités par irradiation pour un cancer de la prostate ou de l'endomètre [70].

Comme pour la génomique, l'arrivée des nouvelles technologies a permis à la protéomique de prendre un nouvel essor et d'identifier de nouveaux marqueurs grâce à un criblage haut débit « à l'aveugle » et sans « a priori ». Identiquement à l'approche protéine-candidate, et toujours dans un souci d'identifier des biomarqueurs accessibles et facilement transposables pour un test de routine clinique, la majorité de ces études se sont focalisées sur l'étude du protéome sérique. Par une approche de type SELDI-TOF (Surface-Enhanced Laser Desorption and Ionization-Time Of Flight), une des premières études a ainsi pu identifier chez 68 patients une série de marqueurs sériques dont le taux variait au cours du traitement [71]. Les auteurs ont ainsi montré que l'expression des protéines sériques peut être modifiée à la suite d'une radiothérapie, et cela pour un grand nombre de cancers et de sites d'irradiation différents. Néanmoins, en dépit des nombreuses protéines identifiées, l'étude n'a pas cherché d'éventuelles corrélations entre radiosensibilité des tissus sains et radiotoxicité induite. Encore à l'heure actuelle, les études protéomiques de criblage à grande échelle restent peu généralisées pour la recherche de biomarqueur prédictifs de la radiotoxicité. Les différents résultats nous permettent de penser qu'il n'existe pas à l'état basal, sans traitement, de différences protéiques suffisamment significatives pour discriminer deux populations avec différents statuts de radiosensibilité. A l'avenir, les études de ce genre devraient plutôt chercher à évaluer la radiosensibilité des cellules après leur avoir fait subir une irradiation. L'observation de la réponse cellulaire et les différents changements moléculaires induits par ce stress génotoxique pourraient alors être le véritable reflet de la radiosensibilité ou de la radiorésistance de l'organisme. Outre

l'amélioration des techniques de criblage, le perfectionnement des analyses bioinformatiques permet également l'identification de nouvelles protéines candidates. Ainsi grâce à un nouvel algorithme et un nouveau système de sélection des protéines d'intérêt, une récente étude a pu montrer et valider par Elisa que l' $\alpha$ -2-macroglobuline était une protéine capable de différencier de manière suffisamment significative une population atteinte d'inflammation pulmonaire radio-induite d'une population n'ayant développé aucune toxicité [72].

## Conclusion

Pour conclure sur les facteurs prédictifs somatiques de radiosensibilité, la recherche de biomarqueurs prédictifs de la réponse tumorale à la radiothérapie est un sujet d'intérêt pour améliorer l'index thérapeutique de la radiothérapie. Les facteurs prédictifs dont le développement est le plus avancé sont le RSI et ses dérivés. Les biomarqueurs moins avancés mais prometteurs sont les facteurs immunologiques notamment basés sur l'étude des TiLs.

Concernant la radiosensibilité individuelle des tissus sains, seul le test apoptose lymphocytaire est utilisé dans certains centres sur la base d'essais prospectifs. Les résultats du **programme hospitalier de recherche clinique (PHRC)** de 2005 multicentrique français sont sans aucun doute le point d'ancrage d'une diffusion plus ample dans la pratique clinique. Dans l'attente, une recherche approfondie en protéomique permet d'entrevoir des résultats encourageants notamment en termes de valeur prédictive positive du test apoptose. La pratique de la radiothérapie sera très prochainement personnalisée. La technologie permet un ciblage optimisé, la biologie aidera les cliniciens et les patients à modifier soit la technique de radiothérapie dans les cas où ce traitement est indispensable, soit la stratégie thérapeutique si une autre alternative moins risquée est disponible dans certaines indications. Quoi qu'il en soit, la population identifiée sans risque majorée de toxicité pourra recevoir une radiothérapie « intensifiée » par une augmentation localisée de dose tout en conservant un bénéfice clinique optimal. Le consortium européen avec l'étude Requite permettra de valider définitivement les données françaises.

## Références

1. van Leeuwen CM, Oei AL, Crezee J, Bel A, Franken NAP, Stalpers LJA et al. The alfa and beta of tumours: a review of parameters of the linear-quadratic model, derived from clinical radiotherapy studies. *Radiat Oncol* 2018 ;13 :96.
2. Hall WA, Bergom C, Thompson RF, Baschnagel AM, Vijayakumar S, Willers H, et al. Precision Oncology and Genomically Guided Radiation Therapy: A Report From the American Society for Radiation Oncology/American Association of Physicists in Medicine/National Cancer Institute Precision Medicine Conference. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2018 ;101 :274-84.
3. Harrell FE Jr., Lee KL, Mark DB. Multivariable prognostic models: issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors. *Stat Med* 1996 ;15 : 361-87.
4. Gail M, Simon R. Testing for qualitative interactions between treatment effects and patient subsets. *Biometrics* 1985 ;41 :361-72.
5. Sargent DJ, Conley BA, Allegra C, Collette L. Clinical trial designs for predictive marker validation in cancer treatment trials. *J Clin Oncol* 2005 ;23 :2020-7.
6. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK). *J Natl Cancer Inst* 2005 ;97 :1180-4.
7. Franceschi S, Mazzanti CM, Lessi F, Aretini P, Carbone FG, La Ferla M et al. Investigating molecular alterations to profile short- and long-term recurrence-free survival in patients with primary glioblastoma. *Oncol Lett* 2015 ;10 :3599-606.
8. Liu X, Cai H, Sheng W, Huang H, Long Z, Wang Y. microRNAs expression profile related with response to preoperative radiochemotherapy in patients with locally advanced gastric cancer. *BMC Cancer* 2018 ;18 :1048.
9. Torres-Roca JF, Eschrich S, Zhao H, Bloom G, Sung J, McCarthy S, et al. Prediction of radiation sensitivity using a gene expression classifier. *Cancer Res* 2005 ;65 :7169-76.

10. Eschrich SA, Pramana J, Zhang H, Zhao H, Boulware D, Lee JH, et al. A gene expression model of intrinsic tumor radiosensitivity: prediction of response and prognosis after chemoradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009 ;75 :489-96.
11. Ahmed KA, Berglund AE, Welsh EA, Naghavi AO, Kim Y, Yu M, et al. The radiosensitivity of brain metastases based upon primary histology utilizing a multigene index of tumor radiosensitivity. *Neuro Oncol* 2017 ;19 :1145-6.
12. Strom T, Harrison LB, Giuliano AR, Schell MJ, Eschrich SA, Berglund A, et al. Tumour radiosensitivity is associated with immune activation in solid tumours. *Eur J Cancer* 2017 ;84 :304-14.
13. Scott JG, Berglund A, Schell MJ, Mihaylov I, Fulp WJ, Yue B, et al. A genome-based model for adjusting radiotherapy dose (GARD): a retrospective, cohort-based study. *Lancet Oncol* 2017 ;18 :202-11.
14. Ahmed KA, Chinnaiyan P, Fulp WJ, Eschrich S, Torres-Roca JF, Caudell JJ. The radiosensitivity index predicts for overall survival in glioblastoma. *Oncotarget* 2015 ;6 :34414-22.
15. Ahmed KA, Fulp WJ, Berglund AE, Hoffe SE, Dilling TJ, Eschrich SA, et al. Differences Between Colon Cancer Primaries and Metastases Using a Molecular Assay for Tumor Radiation Sensitivity Suggest Implications for Potential Oligometastatic SBRT Patient Selection. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2015 ;92 :837-42.
16. Eschrich SA, Fulp WJ, Pawitan Y, Foekens JA, Smid M, Martens JW, et al. Validation of a radiosensitivity molecular signature in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2012 ;18 :5134-43.
17. Strom T, Harrison LB, Giuliano AR, Schell MJ, Eschrich SA, Berglund A, et al. Radiosensitivity index predicts for survival with adjuvant radiation in resectable pancreatic cancer. *Radiother Oncol* 2015 ;117 :159-64.
18. Torres-Roca JF, Fulp WJ, Caudell JJ, Servant N, Bollet MA, van de Vijver M, et al. Integration of a Radiosensitivity Molecular Signature Into the Assessment of Local Recurrence Risk in Breast Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2015 ;93 :631-8.

19. Cuzick J, Swanson GP, Fisher G, Brothman AR, Berney DM, Reid JE, et al. Prognostic value of an RNA expression signature derived from cell cycle proliferation genes in patients with prostate cancer: a retrospective study. *Lancet Oncol* 2011 ;12 :245-55.
20. Freedland SJ, Gerber L, Reid J, Welbourn W, Tikishvili E, Park J, et al. Prognostic utility of cell cycle progression score in men with prostate cancer after primary external beam radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2013 ;86 :848-53.
21. Freedland SJ, Choerung V, Howard L, De Hoedt A, du Plessis M, Yousefi K, et al. Utilization of a Genomic Classifier for Prediction of Metastasis Following Salvage Radiation Therapy after Radical Prostatectomy. *Eur Urol* 2016 ;70 :588-96.
22. Zhao SG, Chang SL, Spratt DE, Erho N, Yu M, Ashab HA, et al. Development and validation of a 24-gene predictor of response to postoperative radiotherapy in prostate cancer: a matched, retrospective analysis. *Lancet Oncol* 2016 ;17 :1612-20.
23. Jang BS, Kim IA. A radiosensitivity gene signature and PD-L1 status predict clinical outcome of patients with invasive breast carcinoma in The Cancer Genome Atlas (TCGA) dataset. *Radiother Oncol* 2017 ;124 :403-10.
24. Ho V, Chung L, Singh A, Lea V, Abubakar A, Lim SH, et al. Overexpression of the MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) complex in rectal cancer correlates with poor response to neoadjuvant radiotherapy and prognosis. *BMC Cancer* 2018 ;18 :869.
25. Soderlund K, Stal O, Skoog L, Rutqvist LE, Nordenskjold B, Askmalms MS. Intact Mre11/Rad50/Nbs1 complex predicts good response to radiotherapy in early breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007 ;68 :50-8.
26. Teo MT, Dyrskjot L, Nsengimana J, Buchwald C, Snowden H, Morgan J, et al. Next-generation sequencing identifies germline MRE11A variants as markers of radiotherapy outcomes in muscle-invasive bladder cancer. *Ann Oncol* 2014 ;25 :877-83.
27. Hess J, Unger K, Maihoefer C, Schuttrumpf L, Wintergerst L, Heider T, et al. A Five-MicroRNA Signature Predicts Survival and Disease Control of Patients with Head and Neck Cancer Negative for HPV Infection. *Clin Cancer Res* 2019 ;25 :1505-16.

28. Lohaus F, Linge A, Tinhofer I, Budach V, Gkika E, Stuschke M, et al. HPV16 DNA status is a strong prognosticator of loco-regional control after postoperative radiochemotherapy of locally advanced oropharyngeal carcinoma: results from a multicentre explorative study of the German Cancer Consortium Radiation Oncology Group (DKTK-ROG). *Radiother Oncol* 2014 ;113 :317-23.
29. Lassen P, Lacas B, Pignon JP, Trotti A, Zackrisson B, Zhang Q, et al. Prognostic impact of HPV-associated p16-expression and smoking status on outcomes following radiotherapy for oropharyngeal cancer: The MARCH-HPV project. *Radiother Oncol* 2018 ;126 :107-15.
30. Rieckmann T, Tribius S, Grob TJ, Meyer F, Busch CJ, Petersen C, et al. HNSCC cell lines positive for HPV and p16 possess higher cellular radiosensitivity due to an impaired DSB repair capacity. *Radiother Oncol* 2013 ;107 :242-6.
31. Chera BS, Kumar S, Beaty BT, Marron D, Jefferys S, Green R, et al. Rapid Clearance Profile of Plasma Circulating Tumor HPV Type 16 DNA during Chemoradiotherapy Correlates with Disease Control in HPV-Associated Oropharyngeal Cancer. *Clin Cancer Res* 2019, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-0211.
32. Galluzzi L, Chan TA, Kroemer G, Wolchok JD, Lopez-Soto A. The hallmarks of successful anticancer immunotherapy. *Sci Transl Med* 2018 ;10(459). pii:eaat7807.doi: 10.1126/scitranslmed.aat7807.
33. Mizunuma M, Yokoyama Y, Futagami M, Aoki M, Takai Y, Mizunuma H. The pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts therapeutic response to radiation therapy and concurrent chemoradiation therapy in uterine cervical cancer. *Int J Clin Oncol* 2015 ;20 :989-96.
34. Liu C, Hu Q, Xu B, Hu X, Su H, Li Q, et al. Peripheral memory and naive T cells in non-small cell lung cancer patients with lung metastases undergoing stereotactic body radiotherapy: predictors of early tumor response. *Cancer Cell Int* 2019 ;19 :121.
35. Masterson L, Lechner M, Loewenbein S, Mohammed H, Davies-Husband C, Fenton T, Sudhoff H, et al. CD8(+) T cell response to human papillomavirus 16 E7 is able to predict survival outcome in oropharyngeal cancer. *Eur J Cancer* 2016 ;67 :141-51.

36. Matsutani S, Shibutani M, Maeda K, Nagahara H, Fukuoka T, Nakao S, et al. Significance of tumor-infiltrating lymphocytes before and after neoadjuvant therapy for rectal cancer. *Cancer Sci* 2018 ;109 :966-79.
37. Puck TT, Marcus PI. Action of x-rays on mammalian cells. *J Exp Med* 1956 ;103 :653-66.
38. Hewitt HB, Wilson CW. A survival curve for mammalian cells irradiated in vivo. *Nature* 1959 ;183 :1060-1.
39. Taylor AM, Harnden DG, Arlett CF, Harcourt SA, Lehmann AR, Stevens S, et al. Ataxia telangiectasia: a human mutation with abnormal radiation sensitivity. *Nature* 1975 ;258 :427-9.
40. Burnet NG, Nyman J, Turesson I, Wurm R, Yarnold JR, Peacock JH. Prediction of normal-tissue tolerance to radiotherapy from in-vitro cellular radiation sensitivity. *Lancet* 1992 ;339 :1570-1.
41. Russell NS, Grummels A, Hart AA, Smolders IJ, Borger J, Bartelink H, et al. Low predictive value of intrinsic fibroblast radiosensitivity for fibrosis development following radiotherapy for breast cancer. *Int J Radiat Biol* 1998 ;73 :661-70.
42. Oppitz U, Denzinger S, Nachtrab U, Flentje M, Stopper H. Radiation-induced comet-formation in human skin fibroblasts from radiotherapy patients with different normal tissue reactions. *Strahlenther Onkol* 1999 ;175 :341-6.
43. Nachtrab U, Oppitz U, Flentje M, Stopper H. Radiation-induced micronucleus formation in human skin fibroblasts of patients showing severe and normal tissue damage after radiotherapy. *Int J Radiat Biol* 1998 ;73 :279-87.
44. Bentzen SM. From cellular to high-throughput predictive assays in radiation oncology: challenges and opportunities. *Semin Radiat Oncol* 2008 ;18 :75-88.
45. West CM, Elyan SA, Berry P, Cowan R, Scott D. A comparison of the radiosensitivity of lymphocytes from normal donors, cancer patients, individuals with ataxia-telangiectasia (A-T) and A-T heterozygotes. *Int J Radiat Biol* 1995 ;68 :197-203.
46. Widel M, Jedrus S, Lukaszczyk B, Raczek-Zwierzycka K, Swierniak A. Radiation-induced micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes is correlated with normal tissue damage in patients with cervical carcinoma undergoing radiotherapy. *Radiat Res* 2003 ;159 :713-21.

47. Rached E, Schindler R, Beer KT, Vetterli D, Greiner RH. No predictive value of the micronucleus assay for patients with severe acute reaction of normal tissue after radiotherapy. *Eur J Cancer* 1998 ;34 :378-83.
48. Twardella D, Popanda O, Helmbold I, Ebbeler R, Benner A, Von Fournier D, et al. Personal characteristics, therapy modalities and individual DNA repair capacity as predictive factors of acute skin toxicity in an unselected cohort of breast cancer patients receiving radiotherapy. *Radiother Oncol* 2003 ;69 :145-53.
49. Ozsahin M, Ozsahin H, Shi Y, Larsson B, Wurgler FE, Crompton NE. Rapid assay of intrinsic radiosensitivity based on apoptosis in human CD4 and CD8 T-lymphocytes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997 ;38 :429-40.
50. Zamai L, Falcieri E, Zauli G, Cataldi A, Vitale M. Optimal detection of apoptosis by flow cytometry depends on cell morphology. *Cytometry* 1993 ;14 :891-7.
51. Ozsahin M, Crompton NE, Gourgou S, Kramar A, Li L, Shi Y, et al. CD4 and CD8 T-lymphocyte apoptosis can predict radiation-induced late toxicity: a prospective study in 399 patients. *Clin Cancer Res* 2005 ;11 :7426-33.
52. Azria D, Belkacemi Y, Romieu G, Gourgou S, Gutowski M, Zaman K, et al. Concurrent or sequential adjuvant letrozole and radiotherapy after conservative surgery for early-stage breast cancer (CO-HO-RT): a phase 2 randomised trial. *Lancet Oncol* 2010 ;11 :258-65.
53. Azria D, Riou O, Castan F, Nguyen TD, Peignaux K, Lemanski C, et al. Radiation-induced CD8 T-lymphocyte Apoptosis as a Predictor of Breast Fibrosis After Radiotherapy: Results of the Prospective Multicenter French Trial. *EBioMedicine* 2015 ;2 :1965-73.
54. Schnarr K, Boreham D, Sathya J, Julian J, Dayes IS. Radiation-induced lymphocyte apoptosis to predict radiation therapy late toxicity in prostate cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009 ;74 :1424-30.
55. Foro P, Algara M, Lozano J, Rodriguez N, Sanz X, Torres E, et al. Relationship between radiation-induced apoptosis of T lymphocytes and chronic toxicity in patients with prostate cancer treated by radiation therapy: a prospective study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2014 ;88 :1057-63.

56. Talbot C, Azria D, Burr T, Chang-Claude J, Dunning A, Farcy Jacquet MP, et al. Analysis of biomarkers for late radiotherapy toxicity in the REQUITE project. Proc ESTRO (Milan), Radiother Oncol 2019 ;133 :343.
57. Andreassen CN, Alsner J. Genetic variants and normal tissue toxicity after radiotherapy: a systematic review. Radiother Oncol 2009 ;92 :299-309.
58. Azria D, Ozsahin M, Kramar A, Peters S, Atencio DP, Crompton NE, et al. Single nucleotide polymorphisms, apoptosis, and the development of severe late adverse effects after radiotherapy. Clin Cancer Res 2008 ;14 :6284-8.
59. Barnett GC, Coles CE, Elliott RM, Baynes C, Luccarini C, Conroy D, 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.
60. Kerns SL, Ostrer H, Stock R, Li W, Moore J, Pearlman A, et al. Genome-wide association study to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with the development of erectile dysfunction in African-American men after radiotherapy for prostate cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2010 ;78 :1292-300.
61. Kerns SL, Ostrer H, Stock R, Li W, Moore J, Pearlman A, et al. Genome-wide association study to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with the development of erectile dysfunction in African-American men after radiotherapy for prostate cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2010 ;78 :1292-300.
62. Hummerich J, Werle-Schneider G, Popanda O, Celebi O, Chang-Claude J, Kropp S, et al. Constitutive mRNA expression of DNA repair-related genes as a biomarker for clinical radio-resistance: A pilot study in prostate cancer patients receiving radiotherapy. Int J Radiat Biol 2006 ;82 :593-604.
63. Wiebalk K, Schmezer P, Kropp S, Chang-Claude J, Celebi O, Debus J, et al. In vitro radiation-induced expression of XPC mRNA as a possible biomarker for developing adverse reactions during radiotherapy. Int J Cancer 2007 ;121 :2340-5.

64. Mayer C, Popanda O, Greve B, Fritz E, Illig T, Eckardt-Schupp F, et al. A radiation-induced gene expression signature as a tool to predict acute radiotherapy-induced adverse side effects. *Cancer Lett* 2011 ;302 :20-8.
65. Chaudhry MA, Kreger B, Omaruddin RA. Transcriptional modulation of micro-RNA in human cells differing in radiation sensitivity. *Int J Radiat Biol* 2010 ;86 :569-83.
66. Lu X, De La Pena L, Barker C, Camphausen K, Tofilon PJ. Radiation-induced changes in gene expression involve recruitment of existing messenger RNAs to and away from polysomes. *Cancer Res* 2006 ;66 :1052-61.
67. Anscher MS, Kong FM, Andrews K, Clough R, Marks LB, Bentel G, et al. Plasma transforming growth factor beta1 as a predictor of radiation pneumonitis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998 ;41 :1029-35.
68. Li C, Wilson PB, Levine E, Barber J, Stewart AL, Kumar S. TGF-beta1 levels in pre-treatment plasma identify breast
69. Hart JP, Broadwater G, Rabbani Z, Moeller BJ, Clough R, Huang D, et al. Cytokine profiling for prediction of symptomatic radiation-induced lung injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005 ;63 :1448-54.
70. Onal C, Kotek A, Unal B, Arslan G, Yavuz A, Topkan E, et al. Plasma citrulline levels predict intestinal toxicity in patients treated with pelvic radiotherapy. *Acta Oncol* 2011; 50 :1167-74.
71. Menard C, Johann D, Lowenthal M, Muanza T, Sproull M, Ross S, et al. Discovering clinical biomarkers of ionizing radiation exposure with serum proteomic analysis. *Cancer Res* 2006 ;66 :1844-50.
72. Oh JH, Craft JM, Townsend R, Deasy JO, Bradley JD, El Naqa I. A bioinformatics approach for biomarker identification in radiation-induced lung inflammation from limited proteomics data. *Journal of proteome research* 2011 ;10 :1406-15.

## **Conflits d'intérêts**

David Azria est co-fondateur de NovaGray. Les autres auteurs déclarent l'absence de conflits d'intérêts.