



(11)

EP 3 108 253 B1

(12)

FASCICULE DE BREVET EUROPEEN

(45) Date de publication et mention
de la délivrance du brevet:
11.09.2019 Bulletin 2019/37

(51) Int Cl.:
G01N 33/573 ^(2006.01) **G01N 33/68** ^(2006.01)
A61N 5/10 ^(2006.01) **A61B 5/00** ^(2006.01)
G01N 21/25 ^(2006.01) **G01N 33/50** ^(2006.01)

(21) Numéro de dépôt: **15709256.0**

(86) Numéro de dépôt international:
PCT/FR2015/050370

(22) Date de dépôt: **16.02.2015**

(87) Numéro de publication internationale:
WO 2015/121597 (20.08.2015 Gazette 2015/33)

(54) **METHODE PREDICTIVE POUR DETERMINER LA RADIOSENSIBILITE TISSULAIRE**

PRÄDIKTIVES VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DER RÖNTGENSTRAHLENEMPFLINDLICHKEIT
VON GEWEBE

PREDICTIVE METHOD FOR DETERMINING TISSUAL RADIOSENSITIVITY

(84) Etats contractants désignés:
**AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB
GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO
PL PT RO RS SE SI SK SM TR**

(74) Mandataire: **Schmidt, Martin Peter**
IXAS Conseil
15, rue Emile Zola
69002 Lyon (FR)

(30) Priorité: **17.02.2014 FR 1451216**
17.02.2014 FR 1451215
10.10.2014 FR 1402281
10.10.2014 FR 1402282

(56) Documents cités:

- **CHARLES THOMAS ET AL:** "Impact of dose-rate on the low-dose hyper-radiosensitivity and induced radioresistance (HRS/IRR) response**", **INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION BIOLOGY**, vol. 89, no. 10, 1 octobre 2013 (2013-10-01), pages 813-822, XP055130896, ISSN: 0955-3002, DOI: 10.3109/09553002.2013.800248
- **COLIN C ET AL:** "MRE11 and H2AX biomarkers in the response to low-dose exposure: balance between individual susceptibility to radiosensitivity and to genomic instability", **INTERNATIONAL JOURNAL OF LOW RADIATION, INDERSCIENCE PUBLISHERS**, vol. 8, no. 2, 13 décembre 2011 (2011-12-13), pages 96-106, XP009179289, ISSN: 1477-6545, DOI: 10.1504/IJLR.2011.044191
- **Michel Bourguignon:** "Actualités en radioprotection Seuil probabiliste chez l'adulte", , 10 février 2012 (2012-02-10), XP055131240, Extrait de l'Internet: URL:http://www.sante.ujf-grenoble.fr/SANTE/alpesmed/evenements/rns/Rencontres_nuclaires_annees_precedentes/rencontresnucleaires_s_sante2012/pdf/vendredi/m_bourguignon_vendredi_10_fevrier_RNS_2012.pdf [extrait le 2014-07-23]

(43) Date de publication de la demande:
28.12.2016 Bulletin 2016/52

(73) Titulaires:

- **Université Claude Bernard Lyon 1**
69622 Villeurbanne, Cedex (FR)
- **Centre National de la Recherche Scientifique**
75794 Paris Cedex 16 (FR)
- **Centre Léon Bérard**
69008 Lyon (FR)
- **Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale**
75654 Paris 13 (FR)

(72) Inventeurs:

- **FORAY, Nicolas**
38300 Meyrie (FR)
- **GRANZOTTO, Adeline**
69008 Lyon (FR)
- **DEVIC, Clément**
69003 Lyon (FR)

Il est rappelé que: Dans un délai de neuf mois à compter de la publication de la mention de la délivrance du brevet européen au Bulletin européen des brevets, toute personne peut faire opposition à ce brevet auprès de l'Office européen des brevets, conformément au règlement d'exécution. L'opposition n'est réputée formée qu'après le paiement de la taxe d'opposition. (Art. 99(1) Convention sur le brevet européen).

EP 3 108 253 B1

- Nicolas Foray: "Les réparatoses : nouveaux concepts sur la prédiction de la radiosensibilité", , 25 janvier 2008 (2008-01-25), XP055131242, Extrait de l'Internet: URL:http://www-sante.ujf-grenoble.fr/SANTE/alpesmed/evenements/rns/Rencontres_nuclaires_annees_precedentes/rencontresnucleaires2008/pdf/25_01_08/04_Foray.pdf [extrait le 2014-07-23]
- A Granzotto ET AL: "Towards a first classification of human radiosensitivity: radiotherapy, radiodiagnosis and history of radiobiology HIGH DOSES STUDIES - THE HUMAN RADIOSENSITIVITY", , 30 mars 2012 (2012-03-30), XP055131016, Extrait de l'Internet: URL:[http://www.crcl.fr/Portals/0/Equipes/EquipeAnsieuPuisieux/poster/radiobiologygroup\(2\).pdf](http://www.crcl.fr/Portals/0/Equipes/EquipeAnsieuPuisieux/poster/radiobiologygroup(2).pdf) [extrait le 2014-07-23]
- JOUBERT A ET AL: "Irradiation in presence of iodinated contrast agent results in radiosensitization of endothelial cells: Consequences for computed tomography therapy", INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION: ONCOLOGY BIOLOGY PHYSICS, PERGAMON PRESS, USA, vol. 62, no. 5, 1 août 2005 (2005-08-01), pages 1486-1496, XP027750052, ISSN: 0360-3016 [extrait le 2005-08-01]
- JOUBERT ET AL: "Radiosensibilité intrinsèque et cassures double-brin de l'ADN dans les cellules humaines", CANCER RADIOTHERAPIE, ELSEVIER, PARIS, FR, vol. 11, no. 3, 23 février 2007 (2007-02-23), pages 129-142, XP022089743, ISSN: 1278-3218, DOI: 10.1016/J.CANRAD.2007.01.003
- CHARLES THOMAS ET AL: "Low-dose hyper-radiosensitivity of progressive and regressive cells isolated from a rat colon tumour: Impact of DNA repair", INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION BIOLOGY, vol. 84, no. 7, 1 juillet 2008 (2008-07-01), pages 533-548, XP055130893, ISSN: 0955-3002, DOI: 10.1080/09553000802195331
- Takamitsu A. Kato ET AL: "Levels of [gamma]-H2AX Foci after Low-Dose-Rate Irradiation Reveal a DNA DSB Rejoining Defect in Cells from Human ATM Heterozygotes in Two AT Families and in Another Apparently Normal Individual", RADIATION RESEARCH, vol. 166, no. 3, 1 September 2006 (2006-09-01), pages 443-453, XP055492007, US ISSN: 0033-7587, DOI: 10.1667/RR3604.1

Description

Domaine technique de l'invention

5 **[0001]** L'invention concerne le domaine de la radiobiologie médicale, et plus particulièrement le domaine des méthodes de laboratoire radiobiologiques. L'invention concerne une nouvelle méthode prédictive de la radiosensibilité cellulaire, tissulaire et clinique, qui se base sur la détermination et le recoupement de plusieurs paramètres et critères cellulaires et enzymatiques.

10 Etat de la technique

[0002] Environ 1 à 15% des patients traités par radiothérapie pour un cancer montrent une réaction tissulaire (tel qu'une dermite ou une rectite) qui peut mettre en jeu le bon déroulement du traitement dans la mesure où elle peut conduire le médecin à décider l'arrêt du traitement radiothérapeutique avant la fin du protocole prévu. Par ailleurs, cette

15 réaction tissulaire est un indicateur d'une sensibilité particulièrement élevée du patient au rayonnement ionisant. Ainsi, le traitement radiothérapeutique, même interrompu au moment de l'apparition des premiers signes tissulaires visibles, peut augmenter la morbidité voire la mortalité post-traitement des patients, non seulement parce que le cancer qu'il était censé traiter n'a pas pu être éradiqué complètement dû à l'arrêt prématuré du traitement, mais encore à cause de l'endommagement collatéral des tissus sain induit par le rayonnement lui-même.

20 **[0003]** On sait également que la question de la sensibilité des tissus au rayonnement ionisant est inséparable de celles des mécanismes de réparation des dommages de l'ADN. En effet, au niveau cellulaire, le rayonnement ionisant peut casser certains types de liaisons chimiques en générant des radicaux libres (en particulier par peroxydation) et d'autres espèces réactives à l'origine des dommages de l'ADN. L'endommagement de l'ADN par des agressions endogènes ou exogènes (telles que les radiations ionisantes et les radicaux libres), peut aboutir à différents types de

25 dommages de l'ADN en fonction notamment de l'énergie déposée : les dommages de bases, les cassures simple-brin et les cassures double-brin (CDB). Les CDB non réparées sont associées à la mort cellulaire, la toxicité et plus spécifiquement la radiosensibilité. Les CDB mal réparées sont associées à l'instabilité génomique, aux phénomènes mutagènes et à la prédisposition au cancer. L'organisme dispose de systèmes de réparation spécifiques à chaque type de dommage de l'ADN. En ce qui concerne les CDB, les mammifères possèdent deux principaux modes de réparation :

30 la réparation par suture (ligation des brins) et la réparation par recombinaison (insertion d'un brin homologue ou non-homologue).

[0004] On sait que la sensibilité des tissus au rayonnement ionisant est très variable d'un organe à l'autre et d'un individu à l'autre ; l'idée d'une « radiosensibilité intrinsèque » a été conceptualisée par Fertil et Malaise en 1981. Ainsi, les diverses études sur les effets thérapeutiques et les effets secondaires de la radiothérapie ont montré qu'il existe des

35 individus qui jouissent d'une radiorésistance particulièrement élevée, et des individus qui montrent au contraire une radiosensibilité qui peut aller d'un effet secondaire reconnu cliniquement mais sans conséquence jusqu'à un effet létal. Même en dehors de certains rares cas de radiosensibilité extrême, dont l'origine génétique semble avérée, on pense que la radiosensibilité découle d'une manière générale d'une prédisposition génétique : elle est donc propre à un individu. Il serait donc désirable de disposer d'une méthode d'essai prédictive pour pouvoir déterminer la dose maximale cumulée

40 qu'un patient donné peut recevoir sans risque. Cette question se pose en premier lieu en radiothérapie dans un contexte de fortes doses ionisantes. Toutefois, cette question est également susceptible de se poser pour toute autre exposition à de fortes doses ionisantes, équivalentes à celles utilisées en radiothérapie.

[0005] On sait que deux protéines de la famille des kinases, appelées couramment ATM et ATR, sont impliquées dans la détection, la réparation et la signalisation des CDB ; leur action nécessite au moins la présence d'une protéine connue sous la désignation BRCA1 et d'une cascade de phosphorylations ordonnée des différents substrats d'ATM

45 (voir l'article de N. Foray et al., « A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein », paru dans The EMBO Journal vol. 22(11), p. 2860-2871 (2003)). L'essai a été entrepris d'utiliser l'enzyme ATM dans un modèle explicatif de la radiosensibilité cellulaire (voir Joubert et al., "DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response ; At least two different assays to predict intrinsic

50 radiosensitivity ?", paru dans Int. J. Radiat. Biol., vol. 84(2), p. 107-125 (2008)), et cela a permis d'identifier trois types de radiosensibilité : les cellules radiorésistantes (radiosensibilité dite de Groupe I), les cellules modérément radiosensibles (radiosensibilité dite de Groupe II), et les cellules extrêmement radiosensibles (radiosensibilité dite de Groupe III). Cependant, aucun modèle prédictif n'a été proposé sur cette base, notamment aucune relation n'a été établie entre les données cliniques (grade de sévérité tissulaire) et les données radiobiologiques. De même, la présentation de N.

55 Foray, « Les réparatoses : nouveaux concepts sur la prédiction de la radiosensibilité », effectuée lors des « Rencontres Nucléaire & Santé » du 25 janvier 2008 (XP55131242) évoque le rôle des différents marqueurs p53 et MRE11 et leurs évolutions au cours du temps pour décrire le nombre de cassures double-brin radioinduites. Cette présentation ne fait pas non plus mention des grades de sévérité tissulaires qui quantifient et répertorient le niveau de radiosensibilité

observé au niveau clinique..

[0006] De nombreux documents décrivent les conditions dans lesquelles l'ATM peut contribuer à la détection et la réparation de l'endommagement de l'ADN. La demande de brevet WO 2004/013634 (KUDOS Pharmaceuticals Ltd) décrit l'identification d'une composante de voie de signalisation de dommage ATM-dépendant de l'ADN qui interagit avec d'autres facteurs de réponse aux dommages de l'ADN, y compris le complexe MRE11/Rad51/NBS1. La demande de brevet US 2007/0072210 (Ouchi et Aglipay) propose une méthode de criblage d'agents thérapeutiques potentiels qui favorisent une réponse aux dommages de l'ADN, dans laquelle on mélange une protéine appelée BAAT1 (qui est associée à une prédisposition au cancer du sein liée au gène BRCA1), une protéine ATM et le composé candidat ; si la phosphorylation de l'ATM est augmentée par rapport à un mélange témoin ne comportant pas le composé candidat, ce dernier est identifié comme un potentiel principe actif favorisant la réparation de l'ADN. La demande de brevet EP 2 466 310 A1 (Helmholtz Zentrum München) décrit la réparation de ruptures de l'ADN de type double brin en présence de la forme phosphorylée de l'histone H2AX (appelée gamma-H2AX ou g-H2AX). La demande WO 00/47760 et le brevet US 7,279,290 (St. Jude's Children's Research Hospital) décrivent le rôle de la fonction kinase de l'ATM dans la réparation de l'ADN.

[0007] Ces derniers documents décrivent donc des voies de réparation mais n'offrent aucune corrélation pour établir un lien avec la clinique.

[0008] Le brevet EP 1 616011 B1 (International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology) propose une méthode pour le diagnostic d'un défaut génétique dans la réparation de l'ADN basée sur trois étapes : la culture de cellules isolées d'un échantillon à tester, l'incubation de ces cellules avec un polypeptide chimérique, la caractérisation de la réponse cellulaire. Ladite réponse cellulaire est le taux d'expression d'un marqueur biochimique consistant en protéines intracellulaires de type p53, ATM, Chk1, Chk2, BRCA1, BRCA2, Nbs1, MRE11, Rad50, Rad51 et des histones. Toutefois, l'expression radioinduite peut ne pas être prédictive de la fonctionnalité de ces protéines (certains syndromes présentent un taux d'expression normale alors que la protéine est mutée) : ces procédures ne sont pas des tests fonctionnels.

[0009] Les demandes de brevet WO 01/90408, WO 2004/059004 et WO 2006/136686 (Commissariat à l'Energie Atomique) décrivent d'autres méthodes pour constater l'endommagement de l'ADN suite à une irradiation ionisante. Le premier document concerne la mise en évidence d'activités d'incision des lésions de l'ADN, il ne permet pas la quantification des activités enzymatiques d'excision et de resynthèse de l'ADN ni de la réparation des CDB. Les deux autres documents décrivent l'évaluation quantitative des capacités d'un milieu biologique à réparer son ADN à l'aide d'ADN double-brin circulaire superenroulé (selon le troisième document : immobilisé dans un film d'hydrogel de polyacrylamide poreux). Ces procédés ne concernent pas directement les CDB dans leur environnement physiologique *in situ* et aucune corrélation n'existe pour valider leur application en clinique.

[0010] KR20030033519 propose de déduire la sensibilité au rayonnement de l'activité de la catalyse ou de la superoxyde dismutase, KR20030033518 utilise la glutathione peroxydase ou la glucose 6-phosphate dehydrogenase. De telles méthodes ne détectent pas des marqueurs directement reliés à l'endommagement ou à la réparation de l'ADN.

[0011] La demande de brevet US 2011/312514 (Dana Farber Cancer Institute) propose d'utiliser la détection des foci FANCD2 comme marqueur. La demande de brevet US 2007/0264648 (National Institute of Radiological Sciences) propose l'utilisation des oligomères de l'ADN pour la prédiction de l'apparition d'effets secondaires lors des radiothérapies. Toutefois, certaines radiosensibilités peuvent être observées alors que le taux de foci FANCD2 est normal.

[0012] Les demandes de brevet US 2008/234946 et US 2012/041908 (University of South Florida et al.) décrivent une méthode pour la prédiction de la radiosensibilité de cellules cancéreuses, et non pas de cellules saines ; elle est en plus basée sur des données génomiques et non des tests fonctionnels.

[0013] La demande de brevet WO2014/154854 (Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier) décrit une méthode pour la prédiction de la radiosensibilité d'un sujet via l'utilisation d'au moins un biomarqueur de radiosensibilité. Cette méthode ne détecte pas des marqueurs directement reliés à l'endommagement ou à la réparation de l'ADN ; elle est en plus basée sur des données protéomiques. De plus, cette demande de brevet ne décrit pas de relation quantitative entre les données radiobiologiques et la sévérité des réactions tissulaires.

[0014] La demande de brevet WO 2013/187973 (University of California) décrit des systèmes et des méthodes de détermination de la radiosensibilité de cellules et/ou d'un sujet au regard d'une population contrôle. Plus particulièrement cette méthode inclut l'irradiation d'un échantillon biologique, la détection et la quantification de foci radioinduits au sein de cellules erythrocytes, lymphocytes ou de cellules primaires, résultant d'un prélèvement sanguin via l'utilisation d'un ou plusieurs marqueurs de détection parmi un ensemble de marqueurs dont l'anti-pH2AX, l'anti-MRE11 et l'anti-ATM. La quantification des foci radioinduits à différents temps d'observation post-irradiation inférieurs à 2 h permet de déterminer leur cinétique de réparation qui est corrélée de manière empirique à la radiosensibilité du sujet. Toutefois, l'analyse des foci dans des cellules de type lymphocyte est très difficile du fait de leur petit noyau. De plus, cette méthode ne permet cependant pas au praticien de prendre des décisions quant au traitement du patient.

[0015] Le brevet US 8,269,163 (New York University School of Medicine) décrit un grand nombre de protéines susceptibles d'être utilisées comme marqueurs pour apprécier de manière simple et rapide l'importance de l'exposition

accidentelle au rayonnement ionisant qu'une personne a subie, en vue de trier les patients et de les orienter vers un traitement d'urgence approprié. Ce dernier brevet concerne la dosimétrie biologique (détermination de la dose accidentelle) alors que la détection de la radiosensibilité s'effectue à partir d'une dose connue.

[0016] La demande de brevet WO 2010/88650 (University of Texas) décrit des méthodes et compositions pour identifier les cellules cancéreuses qui sont soit sensibles soit résistantes à un traitement de radiothérapie particulier ; elles n'est donc pas applicable à tout traitement radiothérapeutique.

[0017] La demande de brevet WO 2010/136942 (Philips) décrit une méthode globale pour surveiller un patient lors d'une radiothérapie à l'aide de biomarqueurs. Le procédé comprend l'obtention d'au moins un descripteur dérivé d'une image extrait d'une modalité d'image, dans lequel le descripteur appartient à un tissu d'intérêt pour lequel est prévue une radiothérapie ou à un tissu dans le voisinage de ce volume cible. Le procédé comprend en outre la sélection d'au moins un marqueur biologique spécifique d'une maladie apte à détecter ou quantifier des effets secondaires de la radiothérapie dans la zone des tissus d'intérêt. En outre, le procédé comprend la récupération d'au moins une valeur de mesure in vitro du biomarqueur spécifique de la maladie sélectionnée. En outre, le procédé comprend le traitement du au moins descripteur de la au moins une valeur de biomarqueur in vitro au moyen d'une technique de corrélation, résultant en un signal de sortie indicatif de la radiotoxicité dans la région du tissu d'intérêt. Toutefois, l'enseignement de ce brevet ne tient compte que de la toxicité dépendant du tissu et non de l'individu et est principalement basée sur l'analyse d'images.

[0018] La demande de brevet WO 2010/109357 décrit un procédé et un appareil pour la planification de protocole de radiothérapie adaptative basée sur l'optimisation de la probabilité de complication des tissus normaux et la probabilité de contrôle tumoral selon des marqueurs spécifiques à chaque patient. Les valeurs des marqueurs associées à des tissus normaux comprennent des valeurs de tests in vitro, les signatures par spectrométrie de masse des protéines, des données de l'anamnèse et les antécédents du patient. Les valeurs d'essai in vitro peuvent être d'origine cellulaire, protéomique et génétique tel que, mais sans s'y limiter, divers comptages de cellules, HB, CRP, PSA, TNF-alpha, ferritine, transferrine, LDH, IL-6, l'hepcidine, créatinine, glucose, HbA1c, et la longueur des télomères. Les marqueurs de l'anamnèse et des antécédents du patient incluent la chirurgie abdominale antérieure, les médicaments hormonaux ou de anticoagulants, le diabète, l'âge, et les mesures liées à la croissance tumorale. Les biomarqueurs non liés à la radiotoxicité sont également envisagés, tels que les biomarqueurs associés à diverses formes d'ablation ou agents chimiothérapeutiques. Toutefois, la radiosensibilité individuelle n'y est pas prise en compte.

[0019] Malgré ce vaste état de la technique, la demanderesse constate que les brevets décrits ci-dessus ne décrivent pas une méthode de quantification de la radiosensibilité individuelle permettant d'évaluer le risque de réactions tissulaires post-radiothérapie, qui puisse être employé pour tout patient et tout type de rayonnement ionisant susceptible d'induire des CDB, et qui soit prédictif. Le problème de fournir une méthode prédictive de la radiosensibilité individuelle reste donc sans solution opérationnelle. La présente invention vise à proposer une nouvelle méthode prédictive de la radiosensibilité tissulaire et clinique.

Objets de l'invention

[0020] Les inventeurs ont constaté, et la méthode selon l'invention part de ce constat, que les cassures double-brin (CDB) de l'ADN sont les dommages radioinduits les plus prédictifs de la radiosensibilité quand ils sont non-réparés d'une part, et de l'instabilité génomique quand ils sont mal réparés d'autre part. Les inventeurs ont découvert que les CDB sont prises en charge par le mode majoritaire de réparation dit de suture, et/ou par le mode minoritaire de réparation fautive dit recombinaison MRE11-dépendante. L'équilibre entre ces deux modes de réparation est contrôlé par la protéine ATM. Le marqueur pH2AX indique un site CDB reconnu par le mode de réparation par suture. Le marqueur MRE11 indique un site de CDB qui a été pris en charge par la réparation fautive MRE11-dépendante. Le marqueur pATM renseigne sur l'activation de la voie de suture par phosphorylation de H2AX et l'inhibition de la voie MRE11-dépendante.

[0021] Les inventeurs ont par ailleurs observé un transfert des formes cytoplasmiques de la protéine ATM dans le noyau cellulaire à la suite d'un stress de type oxydatif, et notamment à la suite d'un stress lié à un rayonnement ionisant induisant des CDB.

[0022] Pour constater l'endommagement d'un ADN par une agression exogène, il faut tenir compte, d'une part, de l'état spontané de l'ADN, et, d'autre part, de son état radioinduit. Par ailleurs, après irradiation, il faut tenir compte de la réparation de l'ADN, dont la cinétique dépend du mécanisme de réparation et donc du type d'endommagement radioinduit. On sait par ailleurs que l'efficacité et la rapidité de la réparation de l'ADN varie d'un individu à l'autre, et qu'il existe en outre des conditions génétiques particulières qui conduisent à une radiosensibilité exceptionnelle.

[0023] Selon l'invention le problème est résolu par une méthode basée sur : 1) une amplification de cellules non transformées, notamment de cellules issues de biopsies de peau ; 2) un modèle mécanistique valable pour les cellules humaines quiescentes ; 3) des tests fonctionnels de la reconnaissance, de la réparation et de la signalisation des CDB valables quelle que soit la modalité thérapeutique.

[0024] L'invention est décrite dans les revendications annexées.

[0025] La description décrit un procédé pour prédire la radiosensibilité cellulaire d'un échantillon cellulaire envers un rayonnement ionisant, ledit échantillon cellulaire ayant été obtenu à partir de cellules prélevées sur un patient dans une zone non irradiée ou peu irradiée, dans lequel procédé :

- (i) on amplifie lesdites cellules prélevées, ces cellules amplifiées constituant « l'échantillon cellulaire » ;
- (ii) on détermine sur ledit échantillon cellulaire le nombre moyen de foci nucléaires obtenus avec le marqueur pH2AX aux temps d'observation t (ce nombre moyen étant appelé $N_{\text{pH2AX}}(t)$), lesdits temps d'observation t étant le temps $t=0$ min (appelé t_0 , état non irradié) et le temps d'observation t_4 (et de préférence en plus les temps t_1 , t_2 et t_3) après irradiation avec une dose absorbée D ;
- (iii) on détermine la dose totale à ne pas dépasser (DTNPD), exprimée en Gray (Gy), en utilisant au moins le paramètre $N_{\text{pH2AX}}(t_4)$;
- (iv) on détermine sur ledit échantillon cellulaire le nombre moyen de foci nucléaires obtenus avec au moins deux des marqueurs pH2AX, pATM et MRE11 aux temps d'observation t (ces nombres moyens étant appelé respectivement $N_{\text{pH2AX}}(t)$, $N_{\text{pATM}}(t)$, $N_{\text{MRE11}}(t)$), lesdits temps d'observation t étant le temps $t=0$ min (appelé t_0 , état non irradié) et au moins un temps d'observation sélectionné parmi $t = t_1$, t_2 , t_3 et t_4 après irradiation avec une dose absorbée D ;
- (v) on détermine le groupe de radiosensibilité de l'échantillon, en utilisant au moins les nombres moyens $N_{\text{pH2AX}}(t)$, $N_{\text{pATM}}(t)$ et $N_{\text{MRE11}}(t)$; et dans lequel procédé
 - t_4 est une valeur fixe qui représente le temps pour lequel le taux de cassures ADN atteint sa valeur résiduelle, et qui est avantageusement choisie entre 6 fois t_3 et 8 fois t_3 , mais doit être dans ce cas être au moins de 12 heures, et de préférence comprise entre 12h et 48h, et qui est encore plus préférentiellement d'environ 24 heures ;
 - t_3 est une valeur fixe qui représente le temps au bout duquel environ 25% des CDB sont réparées dans des cellules témoins issues de patients radiorésistants, et qui est avantageusement choisie entre 3 fois t_2 et 5 fois t_2 , mais doit dans ce cas être au moins de 2,5 heures et au plus de 6 heures, et est de préférence comprise entre 3 heures et 5 heures, et est encore plus préférentiellement environ 4 heures ;
 - t_2 est une valeur fixe qui représente le temps au bout duquel environ 50% des CDB sont réparées dans des cellules témoins issues de patients radiorésistants, et qui est avantageusement choisie entre 5 fois t_1 et 7 fois t_1 , mais qui doit dans ce cas être au moins de 35 minutes et au plus de 90 minutes, et est de préférence compris entre 45 minutes et 75 minutes, et est encore plus préférentiellement environ 60 minutes ;
 - t_1 est une valeur fixe qui représente le temps au bout duquel le nombre de CDB reconnues atteint son maximum dans des cellules témoins issues de patients radiorésistants, et qui est avantageusement choisie entre 5 minutes et 15 minutes après l'arrêt de l'irradiation, de préférence entre 7,5 minutes et 12,5 minutes, et encore plus préférentiellement à environ 10 minutes.

[0026] Dans un mode de réalisation avantageux on utilise également le nombre moyen de foci nucléaires obtenus avec le marqueur pH2AX aux temps d'observation t_1 , t_2 et t_3 pour vérifier la forme de la courbe cinétique de reconnaissance et de réparation des CDB.

[0027] La dose totale à ne pas dépasser (DTNPD), exprimée en Gray (Gy), est un paramètre important pour le radiothérapeute, qui permet de prédire quelle dose maximale un patient donné peut absorber sans subir une réaction potentiellement létale ; ce paramètre permet également d'écarter de la radiothérapie les patients qui présentent une radiosensibilité particulièrement forte.

[0028] La DTNPD est idéalement exprimée en équivalent peau : les expériences étant effectuées sur des fibroblastes cutanés, elle ne peut être extrapolée quantitativement directement sur d'autres tissus. Les prédictions concernent donc essentiellement la réponse radioinduite d'une peau ou un tissu biologiquement équivalent (ex : fibroblastes du poulmon). Toutefois, les extrapolations à d'autres tissus comme l'endothélium, les astrocytes ou les épithéliums peuvent s'effectuer qualitativement dans l'attente de la définition plus précises de facteurs correctifs spécifiques à chaque tissu.

[0029] Selon le procédé décrit ci-dessus, on peut déterminer la DTNPD selon la formule

$$\text{DTNPD} = 60/N_{\text{pH2AX}}(t_4) \quad \text{si } N_{\text{pH2AX}}(t_0) \leq 3,$$

ou selon la formule

$$\text{DTNPD} = 60/[N_{\text{pH2AX}}(t_4) + N_{\text{pH2AX}}(t_0)] \quad \text{si } N_{\text{pH2AX}}(t_0) > 3,$$

EP 3 108 253 B1

[0030] Dans une variante du procédé décrit ci-dessus on détermine sur ledit échantillon cellulaire également le nombre moyen de micronoyaux observés aux temps t pour 100 cellules [en %] (ce nombre moyen étant appelé $N_{MN}(t)$), les temps t étant au moins t_0 (non irradié) et t_4 après irradiation avec une dose absorbée D , on utilise le paramètre $N_{MN}(t_4)$ dans la détermination de la DTNPD. Toutefois, l'incertitude statistique de la mesure expérimentales des micronoyaux étant plus grande que celle du nombre de foci nucléaires observés par immunofluorescence, on favorisera toujours les valeurs prédictives issues de la mesure des foci plutôt que de celle des micronoyaux.

[0031] Ainsi, à titre indicatif, on peut déterminer la DTNPD en fonction de $N_{MN}(t)$ selon la formule

$$DTNPD = 60/[0.4 \times N_{MN}(t_4)], \text{ si } N_{pH2AX}(t_0) \leq 3,$$

ou selon la formule

$$DTNPD = 60/[2 + (0.4 \times N_{MN}(t_4))] \\ \text{si } N_{pH2AX}(t_0) > 3.$$

[0032] L'utilisation de l'une ou l'autre variante du procédé décrit ci-dessus conduit à l'obtention d'un chiffre décimal. La valeur de la DTNPD finale, obtenue après utilisation de l'une ou l'autre des formules est un chiffre ou un nombre entier correspondant à l'arrondi arithmétique de la valeur obtenue par calcul. La DTNPD déterminée selon l'invention correspond à ce chiffre ou à ce nombre entier.

[0033] Dans une variante du procédé décrit ci-dessus et de manière avantageuse le groupe de radiosensibilité du patient est déterminée avant celle de la DTNPD, et ce, afin d'attribuer au patient une valeur correcte de DTNPD pour les patients appartenant au groupe de radiosensibilité de type II (radiosensibilité modérée).

[0034] Le groupe de radiosensibilité de l'échantillon a été déterminée via les formules précédemment décrites, de la manière suivante :

(a) on considère que l'échantillon est radiorésistant si $N_{pH2AX}(t_4) < 2$ et $N_{pATM}(t_1) > N_{pATM}(t_2)$ et $N_{pATM}(t_1) > 30$ et $A < 10$ et $B < 5$ et $C < 2$; sachant que :

$$C = N_{pH2AX}(t_0) + N_{MN}(t_0) ;$$

$B = \% \text{ de gros noyaux (supérieurs à } 150 \mu\text{m}^2 \text{) à } t_0 ;$

$$A = N_{MRE11}(t_0) + \text{Nb de petit foci pH2AX/cellule à } t_0 ;$$

(b) on considère que l'échantillon est très radiosensible si $(N_{pH2AX}(t_4) > 8 \text{ ou } N_{MN}(t_4) > 24)$;

(c) on considère que l'échantillon présente une radiosensibilité modérée pour toutes les autres conditions.

[0035] Pour certains patients, la réparation de l'ADN peut être perturbée par une production incessante de cassures simple-brin de l'ADN (CSB) spontanées dû au phénomène d'hyperrecombinaison qui est généralement observé chez les patients prédisposés aux cancers. La surproduction spontanée de CSB peut avoir deux effets qui ne sont pas contradictoires : à l'état spontané et par marquage pH2AX, des foci nucléaires plus petits que les foci pH2AX habituellement observés peuvent apparaître ; ils sont le reflet de la présence d'un grand nombre de CDB (phénomène de « petits foci »). De même, une surproduction de CSB peut conduire à une décondensation de la chromatine ce qui augmente la taille du noyau des cellules (taille généralement supérieur à $150 \mu\text{m}^2$, correspondant au phénomène des « gros noyaux »). Ces deux phénomènes sont le reflet d'une grande instabilité génomique.

[0036] La DTNPD est ensuite déterminée pour les patients de groupe de radiosensibilité II via les deux variantes présentées précédemment, à savoir selon la formule

$$DTNPD = 60/N_{pH2AX}(t_4) \quad \text{si } N_{pH2AX}(t_0) \leq 3,$$

ou selon la formule

$$DTNPD = 60/[N_{pH2AX}(t_4) + N_{pH2AX}(t_0)] \quad \text{si } N_{pH2AX}(t_0) > 3,$$

ou selon une deuxième variante, on peut déterminer la DTNPD en fonction de $N_{MN}(t)$ selon la formule

$$DTNPD = 60/[0.4 \times N_{MN}(t_4)], \quad \text{si } N_{pH2AX}(t_0) \leq 3,$$

ou selon la formule

$$DTNPD = 60/[2 + (0.4 \times N_{MN}(t_4))] \\ \text{si } N_{pH2AX}(t_0) > 3.$$

[0037] L'utilisation de l'une ou l'autre variante du procédé décrit ci-dessus conduit à l'obtention d'un chiffre décimal. La valeur de la DTNPD finale, obtenue après utilisation de l'une ou l'autre des formules est un chiffre ou un nombre entier correspondant à l'arrondi arithmétique de la valeur obtenue par calcul. La DTNPD déterminée selon l'invention correspond à ce chiffre ou à ce nombre entier.

[0038] Le procédé décrit ci-dessus utilise au moins un échantillon de tissu sain, de préférence des fibroblastes. Ces derniers sont de préférence prélevés sur le tissu conjonctif du patient. Ce prélèvement peut être effectué par biopsie. Ainsi, dans un mode de réalisation avantageux lesdites cellules prélevées sont des cellules fibroblastiques issues d'une biopsie de peau d'un patient (prélevées typiquement selon une méthode connue sous le nom « punch dermatologique »). L'échantillon de tissu est cultivé dans un milieu de culture approprié.

[0039] La première étape du procédé décrit ci-dessus qui suit le prélèvement des cellules (à savoir dans le mode de réalisation préféré via l'établissement de la biopsie en lignée fibroblastique) consiste à caractériser l'état spontané de l'ADN (état à t_0), c'est-à-dire sans irradiation. Cette étape peut comporter notamment l'examen de la taille des noyaux, la présence de micronoyaux, des éventuels corps apoptotiques spontanés et de cellules multilésées : on observe les cellules sous un microscope à fluorescence. En utilisant le colorant DAPI (4'-6'-diamidino-2-phénylindole, n° CAS 28718-90-3 pour le dihydrochlorure) on détermine le taux de micronoyaux pour 100 cellules, qui est un indicateur de l'instabilité génomique. On détermine également les corps apoptotiques. On détermine également la population de noyaux anormalement gros, dont la présence indique la décondensation de la chromatine.

[0040] Ledit rayonnement ionisant est défini par sa dose absorbée (paramètre appelé D et exprimé en Gray). Dans le cadre de la présente invention la dose absorbée D est comprise entre 0,5 Gy et 4 Gy, de préférence comprise entre 1 Gy et 3 Gy, de préférence entre 1,7 Gy et 2,3 Gy, et est encore plus préférentiellement de 2 Gy. Ces zones correspondent typiquement à une séance individuelle de traitement radiothérapeutique, le nombre de séances dépendant de la localisation, du type et du stade d'avancement de la tumeur.

[0041] Il est essentiel pour la méthode décrite ci-dessus que toutes les valeurs de temps t_1 , t_2 , t_3 et t_4 soient définies en début d'une série d'essais (i.e. au moins pour un patient donné, et de préférence pour une pluralité de patients afin de calibrer la méthode par rapport à un ensemble d'observations statistiquement significatifs) et soient les mêmes pour toutes les déterminations de tous les paramètres qui se réfèrent à ces intervalles de temps.

[0042] Dans le procédé selon l'invention, t_1 est avantageusement compris entre 8 minutes et 12 minutes, et/ou t_2 est avantageusement compris entre 50 minutes et 70 minutes, et/ou t_3 est avantageusement compris entre 3,5 heures et 4,5 heures, et/ou t_4 est avantageusement compris entre 22 heures et 26 heures ; de préférence toutes ses quatre conditions sont remplies.

[0043] Dans une variante du procédé qui est particulièrement intéressante et facile à standardiser, t_1 est 10 minutes, t_2 est 60 minutes, t_3 est 4 heures, t_4 est 24 heures, et D est 2 Gy.

[0044] La détermination de $N_{pH2AX}(t)$ fait avantageusement intervenir un test d'immunofluorescence.

[0045] Les cellules témoins issues de patients radiorésistants peuvent être prélevées sur des patients sélectionnés à partir d'un examen clinique comme patients n'ayant pas montré de réactions tissulaires significatives pendant ou à la suite d'un traitement radiothérapeutique. Elles peuvent également être sélectionnées en tant que cellules montrant un taux de survie clonogénique *in vitro* supérieur à 55% après une irradiation avec une dose absorbée de 2 Gy.

[0046] Nous décrivons ici un mode de réalisation typique.

[0047] On observe les cellules avec le marqueur pH2AX. On peut ajouter l'observations avec les marqueurs pATM et/ou MRE11 aux temps d'observation t (ces nombres moyens étant appelés respectivement $N_{pATM}(t)$ et $N_{MRE11}(t)$) et au moins un temps d'observation sélectionné parmi $t=t_1$, t_2 , t_3 et t_4 après irradiation avec une dose absorbée D. Dans un mode de réalisation on détermine le nombre de foci avec le marqueur pH2AX et la présence de cellules multilésées. On note la localisation de la protéine pATM et celle de la protéine MRE11 (nucéaire ou cytoplasmique).

[0048] Cette première étape permet d'identifier une éventuelle instabilité génomique à l'état spontanée.

[0049] La seconde étape du procédé selon l'invention comprend l'irradiation avec la dose absorbée D voulue (par exemple 2 Gy) et l'évaluation de la réponse cellulaire au rayonnement ionisant.

a) Dans un premier mode de réalisation, on étudie la réparation des CDB radioinduites par suture, qui est le mode majoritaire de leur réparation. On détermine le nombre de foci pH2AX par cellule à t4 et optionnellement aussi à t1, t2 et possiblement aussi à t3 ; la détermination à t3 permet de consolider la définition de l'allure des cinétiques de t1 à t4. Dans un mode de réalisation avantageux, après la durée t4 on détermine également le taux de micronoyaux pour en déduire le taux de micronoyaux radioinduits. Cela permet d'estimer la radiosensibilité selon l'importance des CDB non réparées.

b) Dans un deuxième mode de réalisation on approfondit l'étude de la réponse cellulaire au rayonnement ionisant à travers la mesure de la fonctionnalité de l'activité kinase ATM-dépendante. On sait que dans les cellules radiorésistantes témoin, les formes phosphorylées de la protéine ATM (pATM) sont cytoplasmiques à l'état spontané. La demanderesse a découvert qu'à l'état irradié, elles ont tendance à devenir nucléaires. Une fois passées dans le noyau, les formes pATM activent les mécanismes de réparation par suture et inhibent la voie de réparation fautive dépendante de MRE11.

[0050] A titre d'exemple, si après l'irradiation (par exemple avec une dose absorbée de 2 Gy) les formes pATM montent une localisation cytoplasmique, on en conclut que les formes pATM ne passent pas ou ne peuvent pas passer normalement du cytoplasme au noyau. Cela peut être causé par une mutation d'ATM ou de tout autre partenaire protéine d'ATM qui l'aiderait à passer dans le noyau après irradiation : en tout cas, cela indique une radiosensibilité significative.

[0051] Cette détermination optionnelle de la localisation de la protéine pATM est effectuée au moins à t1 et t2, et optionnellement aussi à t3 et t4.

c) dans un troisième mode de réalisation pouvant être combiné avec les précédents, on approfondit l'étude de la réponse cellulaire au rayonnement ionisant à travers la voie MRE11-dépendante. En plus de la voie majeure de réparation par suture dont la capacité est quantifiable par immunofluorescence pH2AX, la demanderesse a identifié une autre voie de réparation, alternative à la suture et qui est susceptible de la remplacer en cas de déficience: c'est la réparation par recombinaison MRE11 dépendante. Sa capacité est quantifiable par l'étude cinétique de l'immunofluorescence des foci MRE11. Cette mesure est effectuée au moins à t1, t2 et t3, et optionnellement aussi à t4. Selon les constatations de la demanderesse, dans les lignées témoins radiorésistantes, MRE11 est cytoplasmique et le nombre de foci MRE11 est très faible jusqu'à 4 heures après une dose 2 Gy (typiquement 7 ± 2 foci MRE11) ; le marquage devient cytoplasmique environ 24 heures après l'irradiation.

[0052] Dans une dernière étape on procède à l'évaluation des résultats en calculant les scores afin de prédire l'état d'endommagement radioinduit et/ou la radiosensibilité du patient, et en particulier la DTNPD qui lui est propre.

Description des figures

[0053] Les figures 1 (a),(b) et (c) montrent respectivement l'évolution du nombre de foci des micronoyaux (a), des marqueurs pH2AX (b) et pATM (c) issus de cellules non irradiées en fonction du grade de sévérité selon la classification CTCAE. Les micronoyaux, les foci pH2AX et pATM issus de cellules non irradiées ne sont pas prédictives de la radiosensibilité.

[0054] Deux échelles différentes de gravité de réactions tissulaires co-existent : la classification CTCAE et la classification RTOC.

[0055] La classification dite CTCAE (Common Terminology Criteria for Adverse Events, appelée en français « Critères d'évaluation de la morbidité selon la classification du National Cancer Institute»), éditée en 2006 par le National Cancer Institute des Etats Unis d'Amérique, est une terminologie descriptive des événements indésirables (en particulier des effets secondaires) en thérapie du cancer.

[0056] Un événement indésirable correspond à tout signe défavorable et involontaire, symptôme ou maladie temporairement associé à l'utilisation d'un traitement médical ou d'une procédure qui peut ou non être considéré comme lié au traitement ou à la procédure médicale. Un événement indésirable est une représentation unique d'un événement spécifique utilisé pour la documentation médicale et lors d'analyses scientifiques.

[0057] La CTCAE fournit une brève définition de chaque événement indésirable pour clarifier le sens de l'événement indésirable. Cette échelle, valable pour d'autres stress génotoxique (ex : blessures causées par le feu) est particulièrement utilisée en radiothérapie.

[0058] Le grade se réfère à la sévérité de l'événement indésirable. La CTCAE affiche 5 grades de sévérité (de 1 à 5) présentant des descriptions cliniques uniques de sévérité pour chaque événement indésirable et décrits dans le tableau 1 ci-après. Chaque grade de sévérité est défini par des réactions tissulaires précises.

Tableau 1 : dernière version de l'échelle CTCAE éditée par le National Cancer Institute des Etats Unis d'Amérique le 14 juin 2010

5	grade 1	Sévérité légère; symptômes asymptomatiques ou légers; observations cliniques ou diagnostiques seules; intervention non indiquée
	grade 2	Sévérité modérée; intervention minimale, intervention locale ou non invasive indiquée; événement limitant les activités de la vie quotidienne instrumentées et adaptées à l'âge (préparation du repas, faire les courses, utilisation du téléphone...)
10	grade 3	Sévérité grave ou médicalement significative, mais ne mettant pas immédiatement la vie en danger; hospitalisation ou prolongation de l'hospitalisation indiquée; événement invalidant; événement limitant les activités de soins de la vie quotidienne (bains, s'habiller, se nourrir, utilisation des toilettes, prise de médicaments, et ne pas être alité)
15	grade 4	Conséquences potentiellement mortelles; intervention urgente indiquée
	grade 5	Décès lié à l'événement indésirable

[0059] A ces 5 grades, est ajouté un grade 0 correspondant à une absence d'effet tissulaire.

[0060] La classification historique dite RTOG, proposée par le Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) en 1984 couvre pratiquement tous les types de toxicités tardives de la radiothérapie.

[0061] Toutefois, la classification RTOG n'est pas applicable pour certains types de cancer sachant que la classification CTCAE, elle, est employée pour tout type de cancer.

[0062] Les figures 2 (a) et 2 (b) présentent l'évolution du nombre de micronoyaux 24 h après irradiation en fonction des grades de sévérité CTCAE (figure 2 (a)) ou RTOG (figures 2 (b)). Les micronoyaux sont marqués avec le marqueur fluorescent DAPI puis quantifiés par l'analyse du signal de fluorescence. Le groupe de radiosensibilité (I, II, III) est indiqué en caractères romains sur la figure 2.

[0063] Le nombre de micronoyaux observé 24 h après irradiation permet uniquement de prédire les radiosensibilités de groupe III.

[0064] Les figures 3 (a), (b) et (c) montrent l'évolution du nombre de foci pH2AX 24 h après irradiation en fonction des grades de sévérité CTCAE (figure 3 (b)) ou RTOG (figure 3 (c)). La figure 3 (a) présente les cinétiques du nombre moyen de foci obtenus avec le marqueur pH2AX au cours du temps.

[0065] Le nombre de foci pH2AX obtenu 24 h après irradiation en fonction des grades de sévérité CTCAE ou RTOG (2 échelles différentes de gravité de réactions tissulaires) permettent de prédire uniquement les radiosensibilités de groupe I, II ou III mais pas les grades de sévérité.

[0066] La figure 4 (A) représente le nombre moyen de foci obtenus avec le marqueur pH2AX 10 minutes après une irradiation avec 2 Gy pour toutes les lignées cellulaires d'une collection d'échantillons de patients (fibroblastes de peau), la ligne pointillée indiquant l'incidence de CDB normale qui est de 40 CDB par Gy par cellule.

[0067] La figure 4 (A) montre que toutes les cellules issues de patients ayant une radiosensibilité de groupe II sont caractérisées par moins de foci pH2AX (de cassures double-brin de l'ADN (CDB)) qu'attendus après 2Gy. Ceci s'explique par le fait que les CDB sont insuffisamment reconnues.

[0068] La figure 4 (B) représente l'expression des pATM dans le cytoplasme et le noyau à différents temps (0 minute, 10 minutes et 1 h) suite à une irradiation de 2 Gy. Les données d'immunofluorescence correspondantes sont présentées pour des cellules non irradiées et pour des cellules irradiées avec 2 Gy à 10 minutes post-irradiation.

[0069] Les données présentées dans la figure 4 (B), relatives aux nombres de foci pATM suggèrent un « transit cytonucléaire » de l'ATM.

[0070] La figure 4 (C) présente les cinétiques du nombre moyen de foci obtenus avec le marqueur pATM au cours du temps à partir de cellules de la collection. Par commodité, les barres d'erreur relatives aux mesures effectuées à 10 min, 1 h, 4 h et 24 h ont été omises. Pour les figures 4 (A) et 4 (C), chaque point représente la moyenne de trois répétitions indépendantes et les barres d'erreur représentent l'écart-type pour chaque catégorie.

[0071] La figure 5 montre l'évolution du nombre de foci pATM en fonction des grades de sévérité CTCAE après 10 minutes (figure 5 (A)) et 1 h suite à une irradiation de 2 Gy (figure 5 (B)). La figure 5 (C) représente le maximum du nombre de foci pATM entre les 2 valeurs obtenues à 10 minutes et 24 h après une irradiation de 2 Gy en fonction des grades de sévérité CTCAE, et précédemment présentées en figure 5(A) et 5(B) respectivement. La figure 5 (B) présente un grade 0, c'est-à-dire une absence d'effet tissulaire.

[0072] La figure 5 (C) montre pour une centaine de patients le lien existant entre ces paramètres radiobiologiques et les grades de sévérité selon la classification CTCAE. La figure 5 (C) représente ainsi la validation clinique de la corrélation existante entre les grades de sévérité CTCAE et le maximum du nombre de foci pATM entre les 2 valeurs obtenues 10

minutes et 1 h après irradiation de 2 Gy.

[0073] Les groupes de radiosensibilité (I, II, IIIa et IIIb) sont indiqués en caractères romains sur la figure 5. Pour les figures 5 (A), 5 (B) et 5 (C), chaque point représente la moyenne de trois répétitions indépendantes, et ce, pour chaque catégorie.

[0074] Le nombre de foci pATM maximal entre (2 Gy + 10 min) ou (2 Gy + 1h) permet de prédire tous les groupes ainsi que le grade de sévérité de la réaction.

[0075] La figure 6 (A) représente le nombre maximum de foci obtenus avec le marqueur pATM en fonction du nombre de foci pH2AX, précédemment représenté en figures 3 (B) et 5 (C) respectivement.

[0076] La figure 6 (B) reprend les données présentées en figure 6 (A) et montre des zones de confiance bien définies représentant les différents groupes de radiosensibilité humaine (Groupe I, Groupe II et Groupe III). La radiosensibilité est déterminée par la reconnaissance et la réparation des cassures double-brin.

[0077] La figure 6 (C) présente l'incidence des groupes pour chaque type de groupes. En considérant que la probabilité d'appartenance à un groupe donné est proportionnelle à l'inverse des zones de confiance correspondants, la fréquence normalisée de chaque groupe est représentée sur la figure 6 (C) par des barres. La ligne en pointillé correspond à la gaussienne produisant le meilleur ajustement des données ($r = 0,9$).

Description de l'invention

A. Définitions générales

[0078] Les termes « endommagement radioinduit », « radioinduit », « radiosensibilité », « radorésistance », « radiotoxicité », « radiothérapie » se réfèrent tous à un rayonnement ionisant, notamment à un rayonnement de type particules, tel que constitué par des particules de type alpha (α) ou bêta (β), ou encore à un rayonnement électromagnétique à haute énergie, notamment de type gamma (γ) ou X.

[0079] Le terme transit cyto-nucléaire d'ATM décrit la translocation qu'effectue la protéine ATM en passant du cytoplasme au noyau, notamment après irradiation.

B. Description détaillée

[0080] Nous décrivons ici un mode de réalisation avec plusieurs variantes qui convient pour un patient humain.

1. Préparation de l'essai

[0081] Avant tout prélèvement de cellules et avant toute manipulation des cellules prélevées, les opérateurs respectifs (appartenant par exemple à un laboratoire d'analyses cytologiques) sont informés (typiquement par le médecin) du statut d'infection éventuelle du patient par HIV ou hépatite C pour que les opérateurs puissent prendre les mesures appropriées de sécurité biologique accrue lors du prélèvement, de la manipulation et de la gestion de la culture cellulaire.

[0082] Puis, l'opérateur prélève au patient un échantillon cellulaire. De préférence il lui prélève par biopsie un échantillon de peau ; ce prélèvement peut se faire avantageusement selon une méthode connue sous le nom « punch dermatologique ». L'échantillon cellulaire est placé dans du milieu DMEM+20% sérum de veau fetal stérile. L'échantillon est transféré sans délai dans un laboratoire spécialisé, sachant que l'échantillon ne doit pas rester plus de 38 h à la température ambiante.

[0083] Dès réception, l'échantillon cellulaire (typiquement la biopsie) est établie sous la forme d'une lignée cellulaire amplifiable sans agent de transformation virale ou chimique suivant une procédure ancillaire et bien connue des laboratoires de culture, comme le souligne la publication d'Elkin M. et al. « *The radiobiology of cultured mammalian cells* », Gordon and Breach (1967). Dès que le nombre de cellules est suffisant (1 semaine - 3 semaines), les premières expériences sont réalisées en utilisant le procédé selon l'invention. Les cellules sontensemencées sur lamelles de verre dans des boîtes de Petri. Une partie de ces lamelles sont irradiées sur un irradiateur médical suivant une dosimétrie certifiée avec une dose absorbée D (par exemple 2 Gy). Une autre partie n'est pas irradiée ; elle représente l'état spontané (dose absorbée 0 Gy).

[0084] L'irradiation peut être effectuée par exemple avec un accélérateur médical qui délivre des photons de 6 MV avec un débit de dose absorbée de 3 Gy min⁻¹. Après l'irradiation et pour subir les temps de réparation mentionnés ci-dessous, les cellules restent dans l'incubateur de culture à 37°C.

[0085] Pour les cellules irradiées, on acquiert des caractéristiques correspondant à l'état radioinduit après plusieurs temps de réparation (temps de réparation post-irradiation). On acquiert de préférence au moins deux et encore plus préférentiellement au moins trois points, à savoir : t1, t2, t3 et t4. Lesdites caractéristiques sont représentées par les foci correspondant au marqueur pH2AX.

[0086] Les cellules sur lamelles de verre sont ensuite fixées, lysées et hybridées. La procédure suivante, connue en

tant que telle (voir la publication citée de Bodgi et al.), peut être utilisée : les cellules ont été fixées dans 3% paraformaldéhyde et 2% sucrose pendant 15 minutes à température ambiante et perméabilisées dans 20 mM solution tampon HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) à pH 7,4, 50 mM NaCl 3 mM MgCl₂, 300 mM sucrose, 0,5% Triton X-100 (un surfactant non-ionique de formule $t\text{-Oct-C}_6\text{H}_4\text{-(OCH}_2\text{CH}_2)_x\text{OH}$ avec $x=9-10$, CAS N° 9002-93-1, fourni par Sigma Aldrich) pendant 3 minutes. Puis les lamelles de couverture ont été lavées dans du tampon phosphate salin (connu sous le sigle PBS) avant coloration immunologique. L'incubation a eu lieu pendant 40 min à 37°C dans du PBS additionné de 2% d'albumine de sérum bovin (connu sous le sigle BSA ou fraction V, fourni par Sigma Aldrich) et a été suivie par un lavage au PBS. Les anticorps primaires anti-pH2AX ont été utilisés à une concentration de 1 : 800, les autres anticorps primaires à 1 : 100. Les incubations avec des anticorps secondaires FITC anti-souris ou TRITC anti-lapin (1:100, fournis par Sigma Aldrich) ont été effectuées à 37°C dans du BSA à 2% pendant 20 minutes. On a traité des lamelles de verre avec du Vectashield™ contenant du DAPI (4,6-Diamidino-2-phénylindole) pour marquer le noyau. La coloration avec du DAPI permet aussi, de manière indirecte, la détermination du nombre de cellules en phase G₁ (noyaux avec coloration DAPI homogène), en phase S (noyaux avec de nombreux foci pH2AX), en phase G₂ (noyaux avec coloration DAPI hétérogène) et métaphases (chromosomes visibles).

[0087] L'acquisition des résultats est effectuée à partir de ces lamelles sur microscope à immunofluorescence (modèle Olympus par exemple). La lecture peut être directe (typiquement par comptage des foci sur au moins 50 cellules en G₀/G₁ pour chaque point) ou par logiciel d'analyse d'image dédié, ou encore sur un microscope automatisé ; de préférence les méthodes par logiciel ou microscope automatisé sont calibrées avec des déterminations manuelles.

[0088] Afin d'obtenir des résultats d'une fiabilité statistique suffisante pour servir comme base d'un diagnostic, au moins 3 séries d'expériences (irradiation) indépendantes sont effectuées et la moyenne de chacun des nombres de foci pour les temps définis est calculée.

2. Détermination des paramètres biologiques et cliniques

2.1 Généralités et marqueurs utilisés

[0089] L'invention est basée entre autres sur l'utilisation de données acquises pour le marqueur pH2AX sur des cellules non-irradiées (état spontané) et irradiées (état radioinduit). La méthode est basée sur l'étude cinétique du marquage par ce marqueur en fonction de la durée de réparation : on marque les échantillons après un laps de temps déterminé à compter de l'arrêt de l'irradiation, et on étudie leur immunofluorescence. On peut mesurer les courbes cinétiques complètes, par exemple représentées par 5 points se situant avantageusement à t₀, t₁ (de préférence 10 minutes), t₂ (de préférence 1h), t₃ (de préférence 4h) et t₄ (de préférence 24h), sachant que t₀ correspond à l'état avant irradiation (état spontané). Il est avantageux d'y associer les données acquises avec deux autres marqueurs, à savoir pATM et MRE11.

[0090] Mais la demanderesse s'est rendu compte que certains points (correspondant à certains temps de réparation) sont plus importants que d'autres, et que certains points ne sont pas prédictifs. Grâce à la sélection judicieuse des paramètres déterminés à des temps donnés, on peut ainsi diminuer le nombre de mesures et donc diminuer le coût global du diagnostic, sans diminuer le pouvoir prédictif de la méthode. C'est cette méthode simplifiée qui constitue la base de la méthode prédictive selon l'invention.

[0091] Les moyennes de chaque point et chaque dose avec chaque marqueurs sont calculées avec les erreurs écart-types de la moyenne (SEM) vu que l'échantillonnage est $n=3$ (pas d'écart-type gaussien de type standard error SE).

(i) pH2AX désigne les formes phosphorylées en sérine 439 du variant X de l'histone H2AX qui marque, selon les constatations de la demanderesse, le nombre de cassures double-brin de l'ADN (CDB) qui sont reconnues par le mode de réparation majoritaire et fidèle, la suture. Le marqueur pH2AX est essentiellement nucléaire sous forme uniquement de foci nucléaire et seuls le nombre et la taille des foci seront analysés.

(ii) pATM désigne les formes phosphorylées en sérine 1981 de la protéine kinase ATM. Selon les constatations de la demanderesse, ATM passe du cytoplasme au noyau après irradiation en conditions normales (statut radio-résistant). Les formes pATM se concentrent principalement dans le cytoplasme puis marquent des sites de CDB. Le marqueur pATM se distingue par une localisation qui peut être cytoplasmique homogène (pas de foci cytoplasmique) sans foci nucléaire, uniquement nucléaire sous forme uniquement de foci nucléaires (pas de localisation nucléaire homogène), soit cytoplasmique et foci nucléaire.

(iii) MRE11 est une endonucléase qui casse l'ADN. Selon les constatations de la demanderesse, MRE11 marque les CDB mal réparées quand le processus de réparation est finalisé. Le marqueur MRE11 peut être soit cytoplasmique sans foci, soit cytoplasmique et nucléaire sans foci, soit cytoplasmique et nucléaire avec foci.

[0092] La contre-coloration au DAPI (un marqueur d'ADN connu de l'homme du métier) permet de localiser le noyau pour situer la localisation cytoplasmique ou nucléaire (cette répartition étant modifiée pour MRE11 et pATM sous l'in-

fluence de la radiation ionisante), pour quantifier les micronoyaux, les corps apoptotiques et la taille des noyaux qui sont des marqueurs cellulaires complémentaires aux données sur les foci.

2.2 Paramètres biologiques

[0093] On définit et détermine comme indiqué :

- $N_{pH2AX}(t)$, $N_{pATM}(t)$, $N_{MRE11}(t)$ les nombres moyens de foci nucléaires obtenus avec les marqueurs pH2AX, pATM, et MRE11 aux temps d'observations t_0 (non irradié) ou t_1 , t_2 , t_3 , t_4 après irradiation (dose absorbée: 2 Gy), sachant que la détermination du paramètre $N_{pH2AX}(t)$ est obligatoire dans le cadre de la méthode selon l'invention, alors que celle des autres paramètres $N_{pATM}(t)$ et $N_{MRE11}(t)$ est facultative mais avantageuse ;
- $N_{MN}(t)$ le nombre de micronoyaux observés spontanément (à $t = t_0$, i.e. sans irradiation) ou à $t = t_4$ après irradiation avec une dose absorbée de 2 Gy pour 100 cellules (en %).

2.3 Evaluation prédictive

[0094] Elle vise la prédiction de paramètres cliniques ou radiothérapeutiques à partir des données biologiques mesurées. Il s'agit d'une analyse quantitative directement issue de la valeur mathématique des scores ou de formules mathématiques reliant les scores ; l'analyse concerne la dose totale à ne pas dépasser pour éviter une réaction potentiellement létale (critère appelé DTNPD) applicable à un patient qui va subir ou qui est en train de subir une radiothérapie :

La dose totale à ne pas dépasser (DTNPD), exprimée en Gray (Gy), est un paramètre important pour le radiothérapeute, qui permet de prédire quelle dose maximale un patient donné peut absorber sans subir une réaction potentiellement létale ; ce paramètre permet également d'écarter de la radiothérapie les patients qui présentent une radiosensibilité particulièrement forte.

[0095] Selon l'invention on peut déterminer la DTNPD selon la formule

$$DTNPD = 60/N_{pH2AX}(t_4) \quad \text{si } N_{pH2AX}(t_0) \leq 3,$$

ou selon la formule

$$DTNPD = 60/[N_{pH2AX}(t_4) + N_{pH2AX}(t_0)] \quad \text{si } N_{pH2AX}(t_0) > 3,$$

[0096] Dans une variante du procédé selon l'invention on détermine sur ledit échantillon cellulaire également le nombre moyen de micronoyaux observés aux temps t pour 100 cellules [en %] (ce nombre moyen étant appelé $N_{MN}(t)$), les temps t étant au moins t_0 (non irradié) et t_4 après irradiation avec une dose absorbée D , on utilise le paramètre $N_{MN}(t_4)$ dans la détermination de la DTNPD. Toutefois, l'incertitude statistique de la mesure expérimentales des micronoyaux étant plus grande que celle du nombre de foci nucléaires observés par immunofluorescence, on préfère utiliser les valeurs prédictives issues de la mesure des foci plutôt que de celle des micronoyaux.

[0097] On détermine alors la DTNPD selon la formule

$$DTNPD = 60/[0.4 \times N_{MN}(t_4)] \quad \text{si } N_{pH2AX}(t_0) \leq 3,$$

ou selon la formule

$$DTNPD = 60/[2 + (0.4 \times N_{MN}(t_4))]$$

$$\text{si } N_{pH2AX}(t_0) > 3.$$

[0098] Sur la base de cette analyse quantitative un diagnostic plus qualitatif peut ensuite être effectué ; il sera influencé par l'analyse quantitative mais tiendra compte d'éventuels éléments cliniques portés à la connaissance du praticien.

[0099] La corrélation existante entre la DTNPD et le nombre de foci pH2AX et le nombre de micronoyaux obtenus après 24 h d'irradiation sous 2 Gy, en fonction du nombre de foci pH2AX à l'état spontané a été validée par l'ensemble des données rétrospectives collectées sur des patients irradiés hyper-radiosensibles mutés dans le gène ATM qui ont succombé à 1 ou 2 sessions de radiothérapie dans les années 1970. Les cas de décès post-irradiation (grade de sévérité 5 selon la classification CTCAE) ont été décrits dans la littérature depuis les années 1970 jusqu'à nos jours et corre-

spondent systématiquement, soit à des cas d'ataxie telangiectasique, soit au cas d'un patient atteint par une mutation de la ligase 4 (voir l'article de A. Joubert et al, « DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response : At least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity ? », paru dans International Journal of Radiation Biology, vol. 84(2), p107-125 (2008)). Sur la base de ces données rétrospectives et connaissant la dose totale cumulée lors de ces sessions de radiothérapie, le parallèle avec le nombre de CDB non réparées correspondant a pu être fait. En effet, le nombre de cassures double-brin non réparées a été mesuré chez un grand nombre de lignées ataxiques et du cas unique de mutation de LIG4 (lignée cellulaire 180BR). Ces lignées montrent systématiquement un taux de cassures non réparées dépassant le seuil de létalité après une dose. Les valeurs des lignées cellulaires de patients AT et 180BR présentées dans le tableau 2 contiennent les preuves de la détermination du seuil à partir duquel le nombre de cassures non réparées est létal pour le patient. Pour ces cas particuliers, le grade CTCAE correspondant est 5 (=décès). La DTNPD peut ainsi être défini comme étant la dose cumulée totale permettant d'atteindre ce fameux nombre de CDB non réparées.

[0100] Dans une autre variante du procédé selon l'invention, on détermine de prime abord le groupe de radiosensibilité sur ledit échantillon cellulaire.

[0101] La définition des groupes de radiosensibilité (GROUPE) aide le médecin à déterminer à partir des scores selon l'invention et du tableau clinique du patient des analogies avec des syndromes génétiques connus. Ces groupes ont été définis dans la publication de Joubert et al qui a déjà été citée.

- Selon l'invention, on considère que :

$$\text{Si } N_{\text{pH2AX}}(t_4) < 2$$

et

$$\text{si } N_{\text{pATM}}(t_1) > N_{\text{pATM}}(t_2)$$

et

$$\text{si } N_{\text{pATM}}(t_1) > 30$$

et

$$\text{si } A < 10$$

et

$$\text{si } B < 5$$

et

$$\text{si } C < 2$$

sachant que :

$$C = N_{\text{pH2AX}}(t_0) + N_{\text{MN}}(t_0) ;$$

$B = \% \text{ de gros noyaux (supérieurs à } 150 \mu\text{m}^2 \text{) à } t_0 ;$

$$A = N_{\text{MRE11}}(t_0) + \text{nombre de petit foci pH2AX/cellule à } t_0 ;$$

alors le groupe de radiosensibilité (critère GROUPE) est considéré comme « Groupe I » : ces cellules sont radio-résistantes.

- Si ($N_{pH2AX}(t4) > 8$ ou $N_{MN}(t4) > 24$)
alors on considère que le groupe de radiosensibilité (critère GROUPE) est considéré comme « Groupe III » : ces cellules sont très radiosensibles.
- Pour toutes les autres conditions, on considère que le critère GROUPE est « Groupe II » : ces cellules montrent une radiosensibilité modérée.

[0102] Après avoir déterminer le groupe de radiosensibilité d'un patient, on détermine ensuite la DTNPD selon l'une ou l'autre des variantes présentées précédemment.

[0103] En pratique, ces formules sont particulièrement adaptées à la détermination de la DTNPD de patients appartenant au groupe de radiosensibilité de type II (radiosensibilité modérée), les patients radiorésistants (groupe I) pouvant subir le traitement standard et les patients hyper-radiosensibles ne devant être irradiés sous aucun prétexte.

[0104] L'invention est illustrée ci-dessous par des exemples qui cependant ne limitent aucunement l'invention. Ces exemples portent sur l'analyse de lignées cellulaires de patients permettant la détermination de la dose totale à ne pas dépasser.

Exemples

1. Préparation de l'essai

[0105] Un échantillon cellulaire de peau d'un patient a été prélevé par biopsie via la méthode de « punch dermatologique » connue de l'homme du métier. L'échantillon cellulaire a ensuite été placé dans du milieu DMEM+20% sérum de veau fetal stérile. L'échantillon cellulaire a ensuite été transféré sans délai dans un laboratoire spécialisé, afin que l'échantillon ne reste pas plus de 38 h à la température ambiante.

[0106] Dès réception, l'échantillon cellulaire issu de la biopsie a été établi sous la forme d'une lignée cellulaire amplifiable suivant une procédure bien connue des laboratoires de culture et de l'homme du métier : en utilisant notamment la dispersion trypsique les cellules sont à nouveau diluées dans du milieu renouvelé et ainsi de suite jusqu'à obtention du nombre de cellules souhaité. Après obtention d'un nombre de cellules suffisant, (généralement au bout d'une à 3 semaines), les premières expériences ont été réalisées en utilisant le procédé selon l'invention. Les cellules ont étéensemencées sur lamelles de verre dans des boîtes de Petri. Une partie de ces lamelles ont été irradiées sur un irradiateur médical suivant une dosimétrie certifiée avec une dose absorbée D (2 Gy). Une autre partie n'a pas été irradiée, cette partie représentant l'état spontané (dose absorbée 0 Gy).

[0107] Les cellules sur lamelles de verre ont ensuite été fixées, lysées et hybridées. Les cellules ont été fixées dans 3% paraformaldéhyde et 2% sucrose pendant 15 minutes à température ambiante et perméabilisées dans 20 mM solution tampon HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) à pH 7,4, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 300 mM sucrose, 0,5% Triton X-100 (un surfactant non-ionique de formule t-Oct-C₆H₄-(OCH₂CH₂)_xOH avec x= 9-10, CAS N° 9002-93-1, fourni par Sigma Aldrich) pendant 3 minutes. Puis les lamelles de couverture ont été lavées dans du tampon phosphate salin (connu sous le sigle PBS) avant coloration immunologique. L'incubation a eu lieu pendant 40 min à 37°C dans du PBS additionné de 2% d'albumine de sérum bovin (connu sous le sigle BSA ou fraction V, fourni par Sigma Aldrich) et a été suivie par un lavage au PBS. Les anticorps primaires anti-pH2AX ont été utilisés à une concentration de 1 :800, les autres anticorps primaires à 1 :100. Les incubations avec des anticorps secondaires FITC anti-souris ou TRITC anti-lapin (1:100, fournis par Sigma Aldrich) ont été effectuées à 37°C dans du BSA à 2% pendant 20 minutes.

[0108] Les lamelles de verre ont ensuite été traitées avec du Vectashield™ contenant du DAPI (4,6-Diamidino-2-phénylindole) pour marquer le noyau. La coloration avec du DAPI a permis de manière indirecte, la détermination du nombre de cellules en phase de quiescence G0/G1 (noyaux avec coloration DAPI homogène), en phase de synthèse S (noyaux avec de nombreux foci pH2AX), en phase de quiescence G2 (noyaux avec coloration DAPI hétérogène) et en phase de mitose M (chromosomes visibles). La contre-coloration au DAPI a permis notamment de localiser le noyau pour situer sa localisation cytoplasmique ou nucléaire, et a permis ainsi de quantifier les micronoyaux présents.

[0109] L'acquisition des résultats a été effectuée à partir de ces lamelles sur microscope à immunofluorescence (modèle Olympus). La lecture a été réalisée de manière directe par comptage des foci obtenus avec les différents marqueurs pH2AX, MRE11 et pATM sur au moins 50 cellules en G0/G1 pour chaque point et par logiciel d'analyse d'image dédié (imageJ).

2. détermination du nombre de foci pH2AX, MRE11 et pATM à l'état spontané et après 10 min (t1), 1h (t2), 4h (t3) et 24h (t4)) de réparation post-irradiation avec une dose absorbée de 2Gy, du nombre de micronoyaux $N_{MN}(t)$ observés à l'état spontané et après 24h de temps de réparation après irradiation avec une dose absorbée de 2 Gy pour 100 cellules (en %), du nombre de petit foci pH2AX par cellule à l'état spontané et du pourcentage de gros noyaux (supérieurs à $150 \mu m^2$) à t0.

[0110] Pour les cellules non-irradiées (état spontané, i.e. à t0), on a acquis le nombre moyen de foci pH2AX à l'état spontané, le nombre de petit foci pH2AX par cellule à l'état spontané, le pourcentage de gros noyaux (supérieurs à $150 \mu m^2$) à t0 et le nombre de micronoyaux observés spontanément via l'analyse de l'immunofluorescence de ces cellules.

[0111] Pour les cellules ayant subi l'irradiation, l'irradiation a été effectuée avec un accélérateur médical qui délivre des photons de 6 MV avec un débit de dose absorbée de $3 Gy \min^{-1}$. Après irradiation avec une dose absorbée de 2 Gy, les cellules ont été conservées dans l'incubateur de culture à $37^\circ C$. Pour les cellules irradiées (état radioinduit), les échantillons ont été marqués après un laps de temps déterminé, à savoir : 10 min (t1), 1h (t2), 4h (t3) et 24h (t4) à compter de l'arrêt de l'irradiation, et on a acquis le nombre moyen de foci nucléaires obtenus avec les marqueurs pH2AX, MRE11 et pATM à ces différents temps de réparation post-irradiation (10 min (t1), 1h (t2), 4h (t3) et 24h (t4)). Le nombre de micronoyaux $N_{MN}(t)$ observés après 24h de temps de réparation après irradiation avec une dose absorbée de 2 Gy pour 100 cellules (en %) a aussi été déterminé via l'analyse de l'immunofluorescence de ces échantillons.

[0112] Afin d'obtenir des résultats d'une fiabilité statistique suffisante pour servir comme base d'un diagnostic, 3 séries d'irradiations indépendantes ont été effectuées. La moyenne et les erreurs écart-types de la moyenne (SEM) de chacun des nombres de foci à l'état spontané (t0), après 10 min (t1), 1h (t2), 4h (t3) et 24h (t4)) de réparation post-irradiation ont été calculées et dont une partie des mesures est présentée dans le tableau ci-après (cf. tableau 2), et ce, pour différents échantillons cellulaires de peau de patients.

Tableau 2 :

Détermination de la radiosensibilité d'un patient et de la DTNPD en fonction du nombre de foci pH2AX, pATM et MRE11 à l'état spontané (t0) et/ou après 10 min (t1), 1h (t2), 4h (t3) et 24h (t4) de réparation post-irradiation sous 2Gy, du nombre de micronoyaux N _{MN} (t) observés à l'état spontané et après 24h de temps de réparation après irradiation (t4) avec une dose absorbée de 2 Gy pour 100 cellules (en %), du nombre de petit foci pH2AX par cellule à l'état spontané et du pourcentage de gros noyaux (supérieurs à 150 µm ²) à t0 et ce, pour différents échantillons cellulaires de peau de patients (*ce patient est radioresistant et peut par conséquent subir un protocole standard de radiothérapie, i.e. recevoir 70 Gy pour le traitement d'un cancer de la prostate, 40 Gy pour le traitement d'un cancer du sein)													
lignée cellulaire	Nbre de foci pH2AX spontané (à t ₀)	Nbre de foci pH2AX par cellule après 24h de réparation (à t ₄)	Nbre moyen de micronoyaux radioinduits après 24h de réparation (à t ₄) (%)	% de gros noyaux (%)	nbre de petit foci pH2AX à t0	N _{MRE11} (à t ₀)	Nbre moyen de micronoyaux (à t ₀)	N _{pATM} après 10 min de réparation (à t ₁)	N _{pATM} après 1 h de réparation (à t ₂)	radiosensibilité de l'échantillon déterminée selon l'invention	Grade de sévérité	Dose totale à ne pas dépasser en équivalent peau (Gy)	
												1 ^{ère} variante tenant compte des foci pH2AX	2 ^{ème} variante tenant compte des micronoyaux
HF19	0±0	0,1±0,0	1±1	0	0	0±0	0±0	40±2	20±1	groupe I	1	600*	75
19HM	0.65±0.07	2.07±0.16	4.67±1.15	0	0	0±0	4.67±1.15	26±4	16.7±8.8	groupe II	2	27-31	26-43
29CLB	1.45±0.23	1.9±0.34	10.67±1.15	0	43.33	0.3±0.3	433,±058	20±6	23.3±3.3	groupe II	3	27-38	13-16
01DAX	1.38±0.24	4.66±0.79	10.17±6.37	0	0	0±0	10.17±6.37	16.7±6.7	23.3±8.8	groupe II	3	11-16	9-39
13CLB	0.69±0.1	1.25±0.21	8.33±3.11	0	0	0±0	3±1	13.3±3.3	15±3	groupe II	4	41-58	13-29
35CLB	1.09±0.23	2.01±0.15	9.67±2	33	0	0±0	2±0	30±6	16.7±3.3	groupe II	2	28-32	13-20
01PAU	2.45±1.21	1.65±0.13	5.33±1.15	1.67	43.33	0±0	5.33±1.15	0±0	23.3±4.4	groupe II	3	34-39	23-36
AT2EM	4.00±1.00	16.00±4.00	25.00±3.00	5	100	0±0	25.0±3.0	0±0	1±0	groupe III	5	2-4	5-6
AT5BI	3.00±1.00	17.00±6.00	30.00±3.00	5	100	0±0	30±3	0±0	0±0	groupe III	5	2-5	4-5
AT4BI	2.00±1.00	22.00±4.00	39.00±3.00	5	100	0±0	4±1	0±0	3±1	groupe III	5	2-3	4
AT1BR	2.00±1.00	12.00±4.00	28.00±3.00	5	100	0±0	4.2±1.0	0±0	1±0	groupe III	5	4-8	5-6
180BR	3.00±1.00	35.00±3.00	37.00±3.00	5	100	0±0	4.5±2.0	36±2	20±1	groupe III	-	1-2	3-4

2.3 Evaluation prédictive de la dose totale à ne pas dépasser

[0113] Ainsi, pour différents échantillons cellulaires de peau de patients (cf. tableau 2), la dose totale à ne pas dépasser par un patient qui va subir ou qui est en train de subir une radiothérapie afin d'éviter une réaction potentiellement létale (critère appelé DTNPD) a été déterminée.

[0114] La dose totale à ne pas dépasser (DTNPD), exprimée en Gray (Gy), a été déterminée par les formules suivantes :

$$\text{DTNPD} = 60/N_{\text{pH2AX}}(t_4) \quad \text{si } N_{\text{pH2AX}}(t_0) \leq 3,$$

ou

$$\text{DTNPD} = 60/[N_{\text{pH2AX}}(t_4) + N_{\text{pH2AX}}(t_0)] \quad \text{si } N_{\text{pH2AX}}(t_0) > 3,$$

[0115] Selon une autre variante de l'invention, la dose totale à ne pas dépasser (DTNPD), exprimée en Gray (Gy), a aussi été déterminée par les formules suivantes tenant compte du nombre moyen de micronoyaux observés aux temps t pour 100 cellules [en %] :

$$\text{DTNPD} = 60/[0.4 \times N_{\text{MN}}(t_4)] \quad \text{si } N_{\text{pH2AX}}(t_0) \leq 3,$$

ou selon la formule

$$\text{DTNPD} = 60/[2 + (0.4 \times N_{\text{MN}}(t_4))] \quad \text{si } N_{\text{pH2AX}}(t_0) > 3.$$

[0116] Les temps t0 et t4 correspondent respectivement à l'état spontané, i.e, non irradié et au temps t4 après irradiation avec une dose absorbée D.

[0117] Les valeurs quantitatives de la dose totale à ne pas dépasser (DTNPD), exprimée en Gray (Gy) sont indiquées dans le tableau 2.

[0118] Les grades de sévérité de 2 à 4 concernent des réactions tissulaires (ex : dermites, rectites, etc). Le grade de sévérité 1 concerne des effets secondaires supportables qui sont souvent confondus, suivant les praticiens avec le grade 0 (absence d'effet).

Revendications

1. Procédé pour prédire la radiosensibilité cellulaire d'un échantillon cellulaire envers un rayonnement ionisant, ledit échantillon cellulaire ayant été obtenu à partir de cellules prélevées sur un patient dans une zone non irradiée ou peu irradiée, dans lequel procédé :

- (i) on amplifie lesdites cellules prélevées, ces cellules amplifiées constituant « l'échantillon cellulaire » ;
- (ii) on détermine sur ledit échantillon cellulaire le nombre moyen de foci nucléaires obtenus avec le marqueur pH2AX aux temps d'observation t (ce nombre moyen étant appelé $N_{\text{pH2AX}}(t)$), lesdits temps d'observation t étant le temps t=0 min (appelé t0, état non irradié) et le temps d'observation t4 après irradiation avec une dose absorbée D comprise entre 1,7 Gy et 2,3 Gy;
- (iii) on détermine la dose totale à ne pas dépasser (DTNPD), exprimée en Gray, en utilisant au moins le paramètre $N_{\text{pH2AX}}(t_4)$

selon la formule $\text{DTNPD} = 60/N_{\text{pH2AX}}(t_4)$ si $N_{\text{pH2AX}}(t_0) \leq 3,$

ou

selon la formule $\text{DTNPD} = 60/[N_{\text{pH2AX}}(t_4) + N_{\text{pH2AX}}(t_0)]$ si $N_{\text{pH2AX}}(t_0) > 3,$

et dans lequel procédé

t4 est une valeur fixe qui représente le temps pour lequel le taux de cassures ADN atteint sa valeur résiduelle.

2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel on détermine sur ledit échantillon cellulaire le nombre moyen de micronoyaux observés aux temps t pour 100 cellules [en %] (ce nombre moyen étant appelé $N_{MN}(t)$), les temps t étant au moins t0 (non irradié) et t4 après irradiation avec une dose absorbée D, et dans lequel on utilise le paramètre $N_{MN}(t4)$ dans la détermination de la DTNPD.

3. Procédé selon la revendication 2, dans lequel on détermine la DTNPD à une dose absorbée D comprise entre 1,7 Gy et 2,3 Gy selon la formule

$$DTNPD = 60/[0.4 \times N_{MN}(t4)] \quad \text{si } N_{pH2AX}(t0) \leq 3,$$

ou selon la formule

$$DTNPD = 60/[2 + (0.4 \times N_{MN}(t4))] \quad \text{si } N_{pH2AX}(t0) > 3.$$

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel lesdites cellules prélevées sont des cellules fibroblastiques issues d'une biopsie de peau d'un patient.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel la dose absorbée D est de 2 Gy.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel la détermination de $N_{pH2AX}(t)$ fait intervenir un test d'immunofluorescence.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel lesdites cellules témoins issues de patients radiorésistants ont été sélectionnées en tant que cellules montrant un taux de survie clonogénique *in vitro* supérieur à 55% après une irradiation avec une dose absorbée de 2 Gy.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans lequel lesdites cellules témoins issues de patients radiorésistants ont été sélectionnées en tant que cellules prélevées sur des patients n'ayant pas montré de réactions tissulaires significatives pendant ou à la suite d'un traitement radiothérapeutique.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 8, dans lequel on utilise le nombre moyen de foci nucléaires obtenus avec le marqueur pH2AX aux temps d'observation t1 et t2 pour vérifier la forme de la courbe cinétique de reconnaissance des sites CDB où

- t2 est une valeur fixe qui représente le temps au bout duquel environ 50% des CDB sont réparées dans des cellules témoins issues de patients radiorésistants, et qui est avantageusement choisie entre 5 fois t1 et 7 fois t1, mais qui doit dans ce cas être au moins de 35 minutes et au plus de 90 minutes, et est de préférence compris entre 45 minutes et 75 minutes, et est encore plus préférentiellement environ 60 minutes ;

- t1 est une valeur fixe qui représente le temps au bout duquel le nombre de CDB reconnues atteint son maximum dans des cellules témoins issues de patients radiorésistants, et qui est avantageusement choisie entre 5 minutes et 15 minutes après l'arrêt de l'irradiation, de préférence entre 7,5 minutes et 12,5 minutes, et encore plus préférentiellement à environ 10 minutes.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, dans lequel on détermine également le nombre moyen de foci nucléaires obtenus avec un moins un des marqueurs pATM et MRE11 aux temps d'observation t (ces nombres moyens étant appelés respectivement $N_{pATM}(t)$ et $N_{MRE11}(t)$) et au moins un temps d'observation sélectionné parmi t=t1, t2 et t4 après irradiation avec une dose absorbée D où

- t4 est une valeur fixe qui représente le temps pour lequel le taux de cassures ADN atteint sa valeur résiduelle, de préférence comprise entre 12h et 48h, et qui est encore plus préférentiellement d'environ 24 heures ;

- t2 est une valeur fixe qui représente le temps au bout duquel environ 50% des CDB sont réparées dans des cellules témoins issues de patients radiorésistants, et qui est avantageusement choisie entre 5 fois t1 et 7 fois t1, mais qui doit dans ce cas être au moins de 35 minutes et au plus de 90 minutes, et est de préférence compris

entre 45 minutes et 75 minutes, et est encore plus préférentiellement environ 60 minutes ;

• t1 est une valeur fixe qui représente le temps au bout duquel le nombre de CDB reconnues atteint son maximum dans des cellules témoins issues de patients radiorésistants, et qui est avantageusement choisie entre 5 minutes et 15 minutes après l'arrêt de l'irradiation, de préférence entre 7,5 minutes et 12,5 minutes, et encore plus préférentiellement à environ 10 minutes.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 10, dans lequel t1 est compris entre 8 minutes et 12 minutes, t2 est compris entre 50 minutes et 70 minutes, et t4 est compris entre 22 heures et 26 heures.

12. Procédé selon la revendication 11, dans lequel t1 est 10 minutes, t2 est 60 minutes, t4 est 24 heures, et D est 2 Gy.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, on détermine le groupe de radiosensibilité du patient avant la DTNPD de la manière suivante :

(a) on considère que l'échantillon est radiorésistant (groupe I) si $N_{pH2AX}(t4) < 2$ et $N_{pATM}(t1) > N_{pATM}(t2)$ et $N_{pATM}(t1) > 30$ et $A < 10$ et $B < 5$ et $C < 2$; sachant que :

$$C = N_{pH2AX}(t0) + N_{MN}(t0) ;$$

$B = \% \text{ de gros noyaux (supérieurs à } 150 \mu\text{m}^2 \text{) à } t0 ;$

$$A = N_{MRE11}(t0) + \text{Nbre de petit foci pH2AX/cellule à } t0 ;$$

(b) on considère que l'échantillon est hyper-radiorésistant (groupe III) si $N_{pH2AX}(t4) > 8$ ou $N_{MN}(t4) > 24$;

(c) on considère que l'échantillon présente une radiosensibilité modérée (groupe II) pour toutes les autres conditions et où

• t4 est une valeur fixe qui représente le temps pour lequel le taux de cassures ADN atteint sa valeur résiduelle, de préférence comprise entre 12h et 48h, et qui est encore plus préférentiellement d'environ 24 heures ;

• t2 est une valeur fixe qui représente le temps au bout duquel environ 50% des CDB sont réparées dans des cellules témoins issues de patients radiorésistants, et qui est avantageusement choisie entre 5 fois t1 et 7 fois t1, mais qui doit dans ce cas être au moins de 35 minutes et au plus de 90 minutes, et est de préférence comprise entre 45 minutes et 75 minutes, et est encore plus préférentiellement environ 60 minutes ;

• t1 est une valeur fixe qui représente le temps au bout duquel le nombre de CDB reconnues atteint son maximum dans des cellules témoins issues de patients radiorésistants, et qui est avantageusement choisie entre 5 minutes et 15 minutes après l'arrêt de l'irradiation, de préférence entre 7,5 minutes et 12,5 minutes, et encore plus préférentiellement à environ 10 minutes.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Vorhersage der Strahlenempfindlichkeit einer Zellprobe gegenüber ionisierender Strahlung, wobei die Zellprobe aus Zellen gewonnen wurde, die einem Patienten in einem nicht bestrahlten oder wenig bestrahlten Bereich entnommen wurden, wobei in diesem Verfahren:

- (i) die entnommenen Zellen amplifiziert werden, und diese amplifizierten Zellen die "zelluläre Probe" darstellen;
- (ii) die mittlere Anzahl von nukleären Foci, die mit dem pH2AX-Marker zu Beobachtungszeiten t erhalten wurden (diese mittlere Anzahl wird als $N_{pH2AX}(t)$ bezeichnet), bestimmt werden, wobei die Beobachtungszeiten t die Zeit $t = 0$ min sind (als t0 bezeichnet, unbestrahlter Zustand) und die Beobachtungszeit t4 nach Bestrahlung mit einer absorbierten Dosis D zwischen 1,7 Gy und 2,3 Gy;
- (iii) die Gesamtdosis, die nicht überschritten werden darf (TDNTBE), ausgedrückt in Gray, unter Verwendung mindestens des Parameters $N_{pH2AX}(t4)$, nach der Formel $TDNTBE = 60 / N_{pH2AX}(t4)$ wenn $N_{pH2AX}(t0) \leq 3$ ist, oder nach der Formel

$$TDNTBE = 60 / [N_{pH2Ax}(t_4) + N_{pH2Ax}(t_0)] \text{ wenn } N_{pH2Ax}(t_0) > 3$$

ist,

bestimmt wird, und wobei t_4 ein fester Wert ist, der die Zeit darstellt, für die die Rate von DNA-Brüchen ihren Restwert erreicht.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei an dieser zellulären Probe die mittlere Anzahl der zu Zeitpunkten t pro 100 Zellen [in%] beobachteten Mikrokerne bestimmt wird (diese mittlere Anzahl wird als $N_{MN}(t)$ bezeichnet), wobei diese Beobachtungszeiten t die Zeit t_0 (nicht bestrahlt) ist, und t_4 nach Bestrahlung mit einer absorbierten Dosis D , und wobei der N_{MN} -Wert(t_4) bei der Bestimmung der TDNTBE verwendet wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die TDNTBE für eine absorbierte Dosis zwischen 1,7 Gy und 2,3 Gy gemäß der Formel $TDNTBE = 60 / [0,4 \times N_{MN}(t_4)]$ bestimmt wird, wenn $N_{pH2Ax}(t_0) \leq 3$ ist, oder gemäß der Formel

$$TDNTBE = 60 / [2 + (0,4 \times N_{MN}(t_4))], \text{ wenn } N_{pH2Ax}(t_0) > 3$$

ist.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die entnommenen Zellen Fibroblastenzellen sind, die aus einer Hautbiopsie eines Patienten stammen.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die absorbierte Dosis 2 Gy beträgt.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Bestimmung von $N_{pH2Ax}(t)$ einen Immunfluoreszenztest beinhaltet.

7. Verfahren nach Anspruch 1 bis 6, wobei diese Kontrollzellen von strahlenresistenten Patienten als Zellen ausgewählt wurden, die nach Bestrahlung mit einer absorbierten Dosis von 2 Gy eine klonogene In-vitro-Überlebensrate von mehr als 55% aufweisen.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei diese Kontrollzellen von strahlenresistenten Patienten als Zellen ausgewählt wurden, die Patienten entnommen wurden, die während oder nach einer strahlentherapeutischen Behandlung keine signifikanten Gewebereaktionen zeigten.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 8, bei dem die mittlere Anzahl von nukleären Foci, die mit dem P_{H2AX} -Marker zu den Beobachtungszeiten t_1 und t_2 erhalten wurden, verwendet wird, um die Form der kinetischen Erkennungskurve der DSBs zu überprüfen, wobei

- t_2 ein fester Wert ist, der die Zeit darstellt, nach der etwa 50% der DSBs in Kontrollzellen von strahlenresistenten Patienten repariert werden, und der vorteilhafterweise zwischen dem 5-fachen von t_1 und dem 7-fachen von t_1 gewählt wird, in diesem Fall aber mindestens 35 Minuten und höchstens 90 Minuten betragen muss, und der vorzugsweise zwischen 45 Minuten und 75 Minuten liegt, und noch bevorzugter bei etwa 60 Minuten liegt;

- t_1 ein fester Wert ist, der die Zeit darstellt, nach der die Anzahl der erkannten DSBs in Kontrollzellen von strahlenresistenten Patienten ihr Maximum erreicht, und der vorteilhafterweise zwischen 5 Minuten und 15 Minuten nach Beendigung der Bestrahlung ausgewählt wird, bevorzugt zwischen 7,5 Minuten und 12,5 Minuten liegt, und noch bevorzugter bei ungefähr 10 Minuten liegt.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, bei dem man zusätzlich an der Zellprobe die mittlere Anzahl der mit mindestens einem der Marker $pATM$ und $MRE11$ erhaltenen nukleären Foci bei den Beobachtungszeiten t bestimmt werden (diese mittleren Zahlen werden jeweils $N_{pATM}(t)$ und $N_{MRE11}(t)$ genannt), und mindestens eine Beobachtungszeit ausgewählt aus $t = t_1, t_2$ und t_4 nach Bestrahlung mit einer absorbierten Dosis D , wobei

- t_4 ein fester Wert ist, der die Zeit darstellt, für die die Rate der DNA-Brüche ihren Restwert erreicht, und der vorzugsweise zwischen 12 und 48 Stunden liegt und noch bevorzugter etwa 24 Stunden beträgt;

- t_2 ein fester Wert ist, der die Zeit darstellt, nach der etwa 50% der DSBs in Kontrollzellen von strahlenresistenten

Patienten repariert werden, und der vorteilhafterweise zwischen dem 5-fachen von t1 und dem 7-fachen von t1 gewählt wird, in diesem Fall aber mindestens 35 Minuten und höchstens 90 Minuten betragen muss, und der vorzugsweise zwischen 45 Minuten und 75 Minuten liegt, und noch bevorzugter bei etwa 60 Minuten liegt;
 - t1 ein fester Wert ist, der die Zeit darstellt, nach der die Anzahl der erkannten DSBs in Kontrollzellen von strahlenresistenten Patienten ihr Maximum erreicht, und der vorteilhafterweise zwischen 5 Minuten und 15 Minuten nach Beendigung der Bestrahlung ausgewählt wird, bevorzugt zwischen 7,5 Minuten und 12,5 Minuten liegt, und noch bevorzugter bei ungefähr 10 Minuten liegt.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 oder 10, wobei t1 zwischen 8 Minuten und 12 Minuten liegt, t2 zwischen 50 Minuten und 70 Minuten, und t4 zwischen 22 Stunden und 26 Stunden.

12. Verfahren nach Anspruch 11, bei dem t1 10 Minuten beträgt, t2 60 Minuten beträgt, t3 4 Stunden beträgt, t4 24 Stunden beträgt und D 2 Gy beträgt.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei die die Gruppe der Strahlenempfindlichkeit des Patienten vor der TDNTBE auf folgende Weise bestimmt wird:

(a) Die Probe wird als strahlenresistent (Gruppe 1) angesehen, wenn $N_{pH2Rx}(t4) < 2$ und $N_{pATM}(t1) > N_{pATM}(t2)$ und $N_{pATM}(t1) > 30$ und $A < 10$ und $B < 5$ und $C < 2$; wobei:

$$C = N_{pH2Ax}(t0) + N_{MN}(t0);$$

B = % der großen Kerne (größer als $150 \mu m^2$) bei t0;

$$A = N_{MRE11}(t0) + \text{Anzahl der kleinen Foci } pH2Ax / \text{Zelle}$$

bei t0;

(b) die Probe wird als hoch strahlenempfindlich (Gruppe III) angesehen, wenn $(N_{pH2Ax}(t4) > 8 \text{ oder } N_{MN}(t4) > 24)$;

(c) die Probe wird für alle anderen Bedingungen als mäßig strahlenempfindlich (Gruppe II) eingestuft, und wobei

- t4 ein fester Wert ist, der die Zeit darstellt, für die die Rate der DNA-Brüche ihren Restwert erreicht, und der vorzugsweise zwischen 12 und 48 Stunden liegt und noch bevorzugter etwa 24 Stunden beträgt;

- t2 ein fester Wert ist, der die Zeit darstellt, nach der etwa 50% der DSBs in Kontrollzellen von strahlenresistenten Patienten repariert werden, und der vorteilhafterweise zwischen dem 5-fachen von t1 und dem 7-fachen von t1 gewählt wird, in diesem Fall aber mindestens 35 Minuten und höchstens 90 Minuten betragen muss, und der vorzugsweise zwischen 45 Minuten und 75 Minuten liegt, und noch bevorzugter bei etwa 60 Minuten liegt;

- t1 ein fester Wert ist, der die Zeit darstellt, nach der die Anzahl der erkannten DSBs in Kontrollzellen von strahlenresistenten Patienten ihr Maximum erreicht, und der vorteilhafterweise zwischen 5 Minuten und 15 Minuten nach Beendigung der Bestrahlung ausgewählt wird, bevorzugt zwischen 7,5 Minuten und 12,5 Minuten liegt, und noch bevorzugter bei ungefähr 10 Minuten liegt.

Claims

1. Method for predicting cellular radiosensitivity of a cell sample to ionizing radiation, said cell sample having been obtained from cells sampled from a patient in a non-irradiated or slightly irradiated zone, in which method:

(i) said sampled cells are amplified, said amplified cells forming "the cellular sample";

(ii) on said cellular sample, the mean number of nuclear foci obtained with the pH2AX marker is determined at the observation time t (this mean number being called $N_{pH2Ax}(t)$), said observation time t being the time t=0 min (called t0, non-irradiated state) and the observation time t4 after irradiation with an absorbed dose D comprised between 1,7 Gy and 2,3 Gy;

(iii) the total dose not to be exceeded (TDNTBE) is determined, expressed in Gray (Gy), using at least the parameter $N_{pH2Ax}(t4)$, according to the formula:

$$TDNTBE = 60/N_{pH2AX}(t_4) \text{ if } N_{pH2AX}(t_0) \leq 3,$$

or according to the formula:

$$TDNTBE = 60/[N_{pH2AX}(t_4) + N_{pH2AX}(t_0)] \text{ if } N_{pH2AX}(t_0) > 3;$$

and in which method t4 is a fixed value that represents the time for which the DNA break level reaches its residual value.

2. Method according to claim 1, in which the mean number of micronuclei observed at time t for 100 cells [in %] is determined on said cellular sample (this mean number being called $N_{MN}(t)$), the time t being at least t0 (non-irradiated) and t4 after irradiation with an absorbed dose D, and in which the parameter $N_{MN}(t_4)$ is used to determine the TDNTBE.

3. Method according to claim 2, in which the TDNTBE is determined at an absorbed dose comprised between 1,7 Gy and 2,3 according to the formula:

$$TDNTBE = 60/[0.4 \times N_{NM}(t_4)] \text{ if } N_{pH2AX}(t_0) \leq 3,$$

or according to the formula:

$$TDNTBE = 60/[2 + (0.4 \times N_{NM}(t_4))] \text{ if } N_{pH2AX}(t_0) > 3.$$

4. Method according to any one of claims 1 to 3, in which said sampled cells are fibroblast cells obtained from a patient skin biopsy.

5. Method according to any one of claims 1 to 4, in which the absorbed dose D is 2 Gy.

6. Method according to any one of claims 1 to 5, in which the determination of $N_{pH2AX}(t)$ involves an immunofluorescence test.

7. Method according to any one of claims 1 to 6, in which said control cells obtained from radioresistant patients were selected as cells showing an *in vitro* clonogenic survival rate greater than 55% after irradiation with an absorbed dose of 2 Gy.

8. Method according to any one of claims 1 to 7, in which said control cells obtained from radioresistant patients were selected as cells sampled from patients not having shown significant tissue reactions during or after a radiotherapy treatment.

9. Method according to any one of claims 3 to 8, in which the mean number of nuclear foci obtained with the pH2AX marker at observation times t1 and t2 is used to verify the shape of the kinetic curve of DSB site recognition, wherein

- t2 is a fixed value representing the time at the end of which approximately 50% of the DSB are repaired in the control cells taken from radioresistant patients, and which is advantageously chosen to be between 5 times t1 and 7 times t1, but in this case must be at least 35 minutes and at most 90 minutes, and is preferably between 45 minutes and 75 minutes, and is more preferably approximately 60 minutes;

- t1 is a fixed value representing the time at the end of which the number of DSB recognized has reached a maximum in the control cells taken from radioresistant patients, and which is advantageously chosen to be between 5 minutes and 15 minutes after the end of irradiation, preferably between 7.5 minutes and 12.5 minutes, and yet more preferably to be around 10 minutes.

10. Method according to any one of claims 1 to 9, in which the mean number of nuclear foci obtained with at least one of the pATM and MRE11 markers at observation time t (these mean numbers being called, respectively, $N_{pATM}(t)$ and $N_{MRE11}(t)$) and at least one observation time selected from t=t1, t2, and t4 after irradiation with an adsorbed dose D is also determined, wherein

- t4 is a fixed value representing the time taken for the rate of DNA breaks to attain the residual value thereof, preferably between 12 h and 48 h, and which is more preferably approximately 24 hours;
- t2 is a fixed value representing the time at the end of which approximately 50% of the DSB are repaired in the control cells taken from radioresistant patients, and which is advantageously chosen to be between 5 times t1 and 7 times t1, but in this case must be at least 35 minutes and at most 90 minutes, and is preferably between 45 minutes and 75 minutes, and is more preferably approximately 60 minutes;
- t1 is a fixed value representing the time at the end of which the number of DSB recognized has reached a maximum in the control cells taken from radioresistant patients, and which is advantageously chosen to be between 5 minutes and 15 minutes after the end of irradiation, preferably between 7.5 minutes and 12.5 minutes, and yet more preferably to be around 10 minutes.

11. Method according to any one of claims 9 to 10, in which t1 is comprised between 8 minutes and 12 minutes, t2 is comprised between 50 minutes and 70 minutes, and t4 is comprised between 22 hours and 26 hours.

12. Method according to claim 11, in which t1 is 10 minutes, t2 is 60 minutes, t4 is 24 hours, and D is 2 Gy.

13. Method according to any one of claims 1 to 12, in which the radiosensitivity group of the patient is determined before the TDNTBE as follows:

- (a) the sample is considered to be radioresistant (group I) if $N_{\text{pH2AX}}(t_4) < 2$ and $N_{\text{pATM}}(t_1) > N_{\text{pATM}}(t_2)$ and $N_{\text{pATM}}(t_1) > 30$ and $A < 10$ and $B < 5$ and $C < 2$; with:

$$C = N_{\text{pH2AX}}(t_0) + N_{\text{MN}}(t_0);$$

B = % large nuclei (greater than $150 \mu\text{m}^2$) at t0;

$$A = N_{\text{MRE11}}(t_0) + \text{Number of small pH2AX foci per cell at } t_0;$$

- (b) the sample is considered to be highly radiosensitive (group III) if $(N_{\text{pH2AX}}(t_4) > 8 \text{ or } N_{\text{MN}}(t_4) > 24)$;

- (c) the sample is considered to have moderate radiosensitivity (group II) for all other conditions, and wherein

- t4 is a fixed value representing the time taken for the rate of DNA breaks to attain the residual value thereof, preferably between 12 h and 48 h, and which is more preferably approximately 24 hours;
- t2 is a fixed value representing the time at the end of which approximately 50% of the DSB are repaired in the control cells taken from radioresistant patients, and which is advantageously chosen to be between 5 times t1 and 7 times t1, but in this case must be at least 35 minutes and at most 90 minutes, and is preferably between 45 minutes and 75 minutes, and is more preferably approximately 60 minutes;
- t1 is a fixed value representing the time at the end of which the number of DSB recognized has reached a maximum in the control cells taken from radioresistant patients, and which is advantageously chosen to be between 5 minutes and 15 minutes after the end of irradiation, preferably between 7.5 minutes and 12.5 minutes, and yet more preferably to be around 10 minutes.

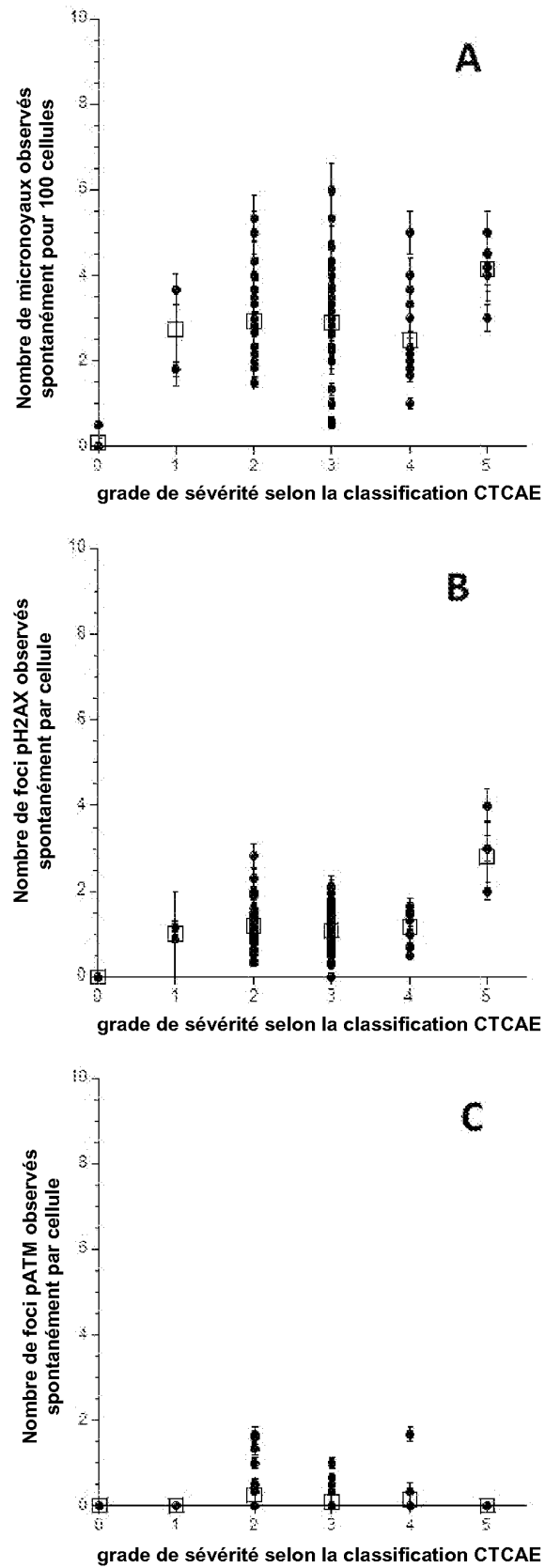


Figure 1

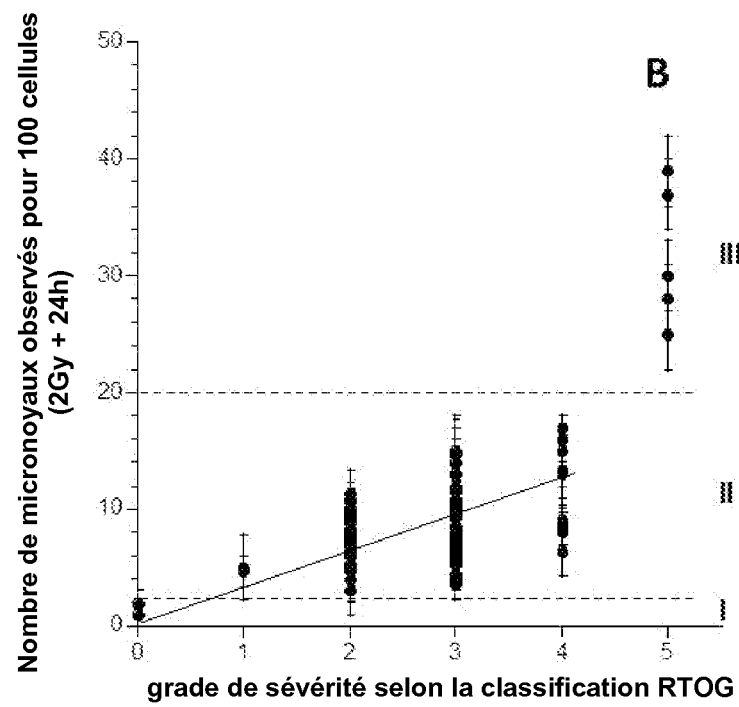
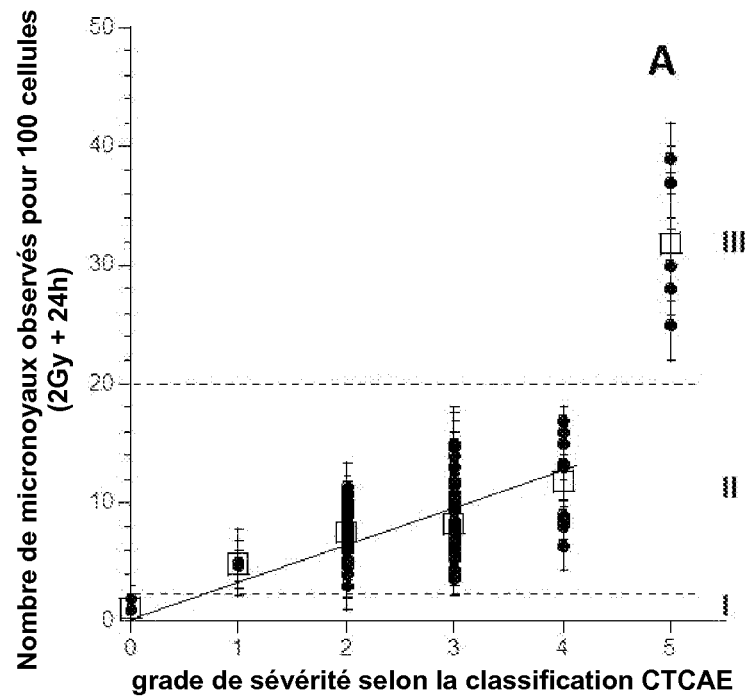


Figure 2

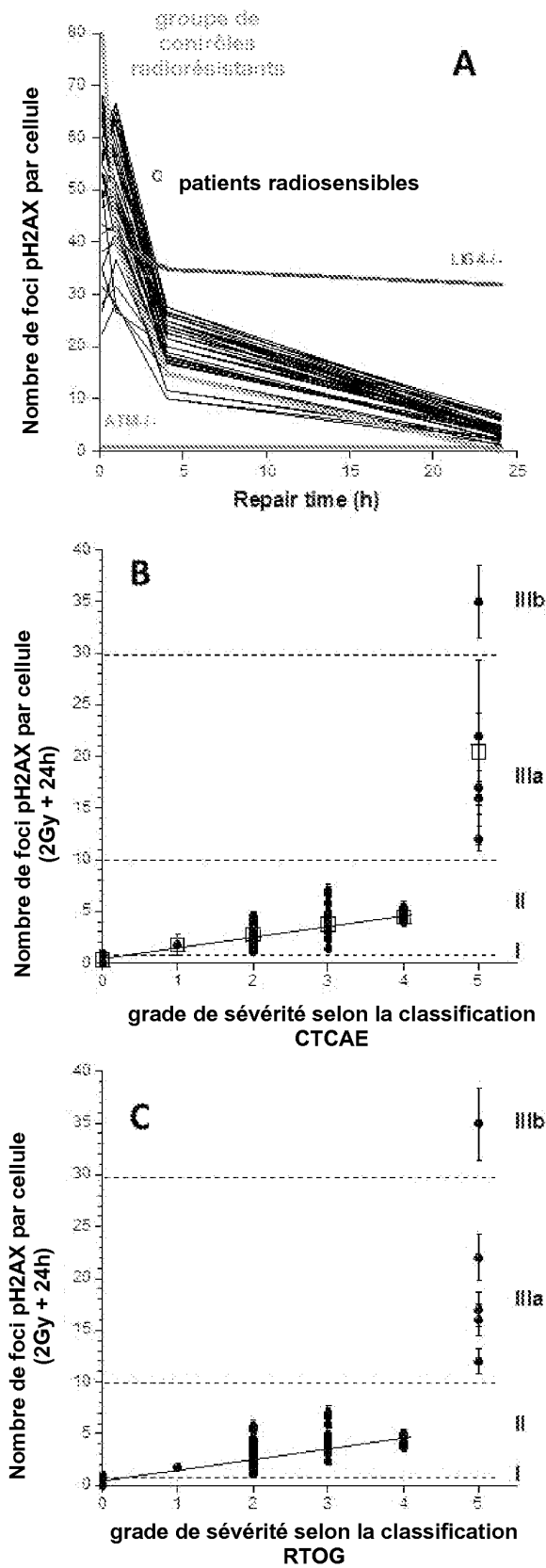


Figure 3

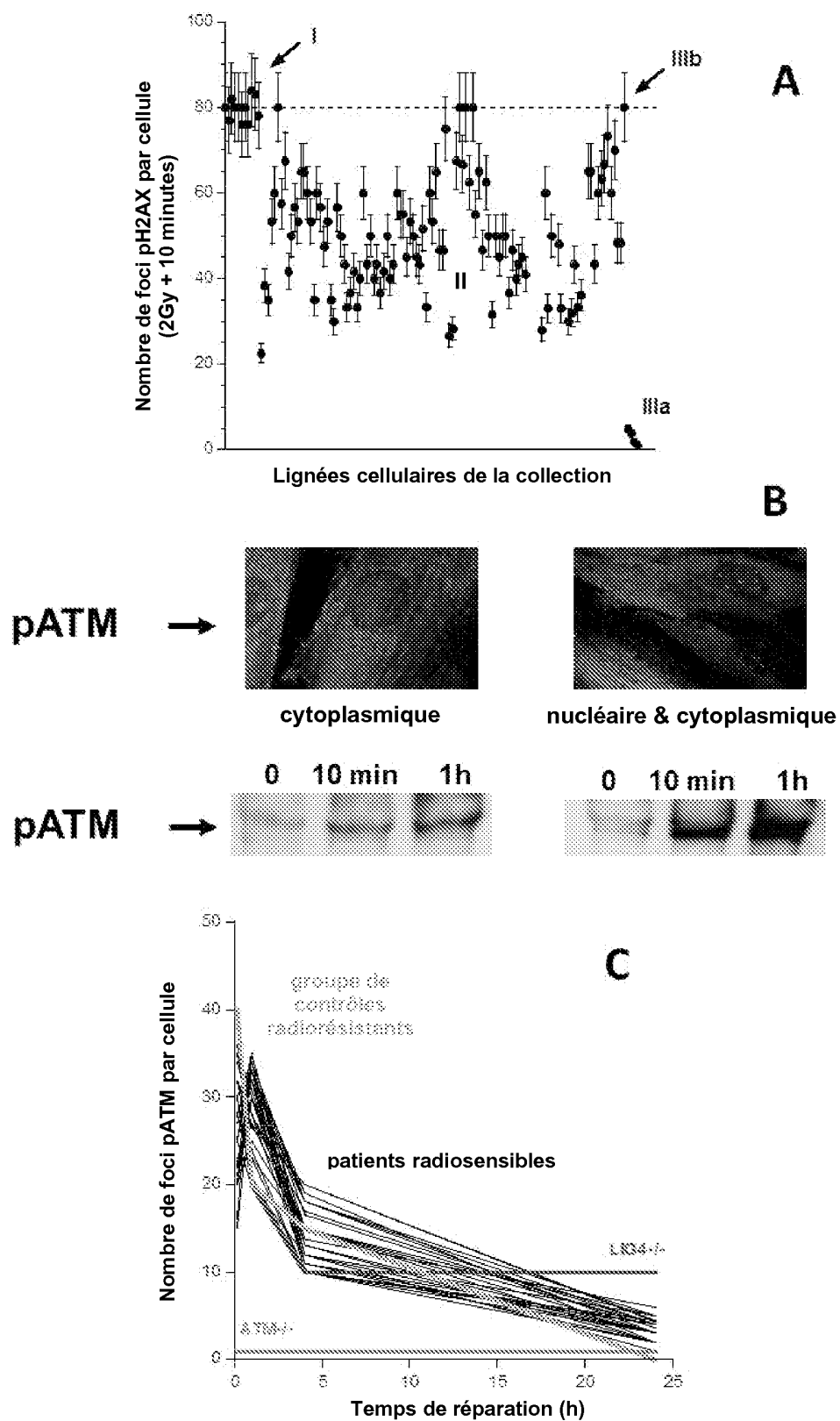


Figure 4

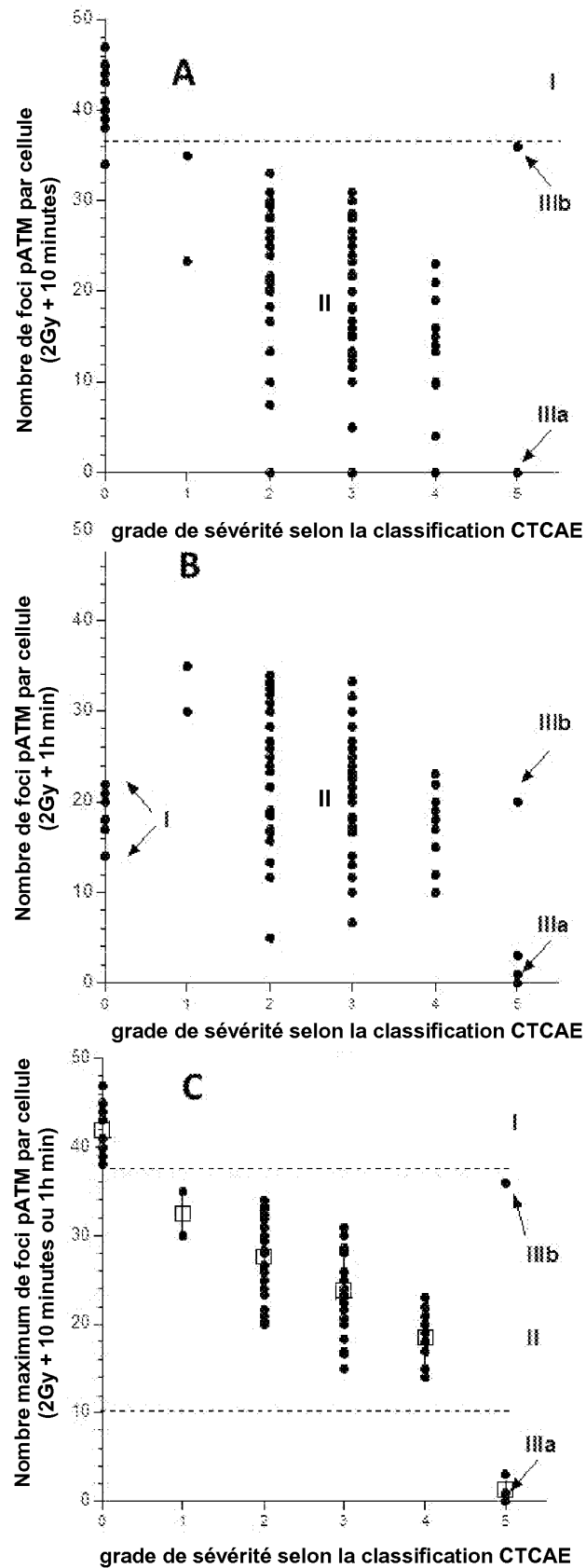


Figure 5

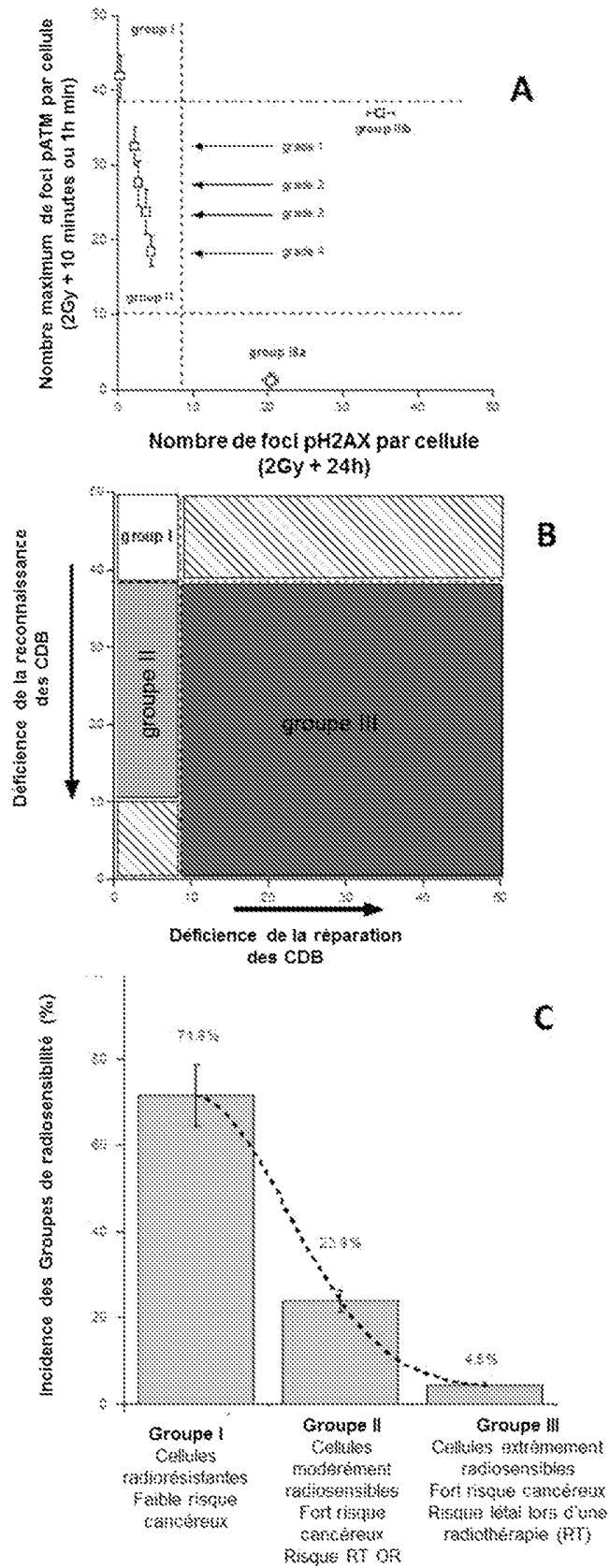


Figure 6

RÉFÉRENCES CITÉES DANS LA DESCRIPTION

Cette liste de références citées par le demandeur vise uniquement à aider le lecteur et ne fait pas partie du document de brevet européen. Même si le plus grand soin a été accordé à sa conception, des erreurs ou des omissions ne peuvent être exclues et l'OEB décline toute responsabilité à cet égard.

Documents brevets cités dans la description

- WO 2004013634 A [0006]
- US 20070072210 A, Ouchi et Aglipay [0006]
- EP 2466310 A1 [0006]
- WO 0047760 A [0006]
- US 7279290 B [0006]
- EP 1616011 B1 [0008]
- WO 0190408 A [0009]
- WO 2004059004 A [0009]
- WO 2006136686 A [0009]
- KR 20030033519 [0010]
- KR 20030033518 [0010]
- US 2011312514 A [0011]
- US 20070264648 A [0011]
- US 2008234946 A [0012]
- US 2012041908 A [0012]
- WO 2014154854 A [0013]
- WO 2013187973 A [0014]
- US 8269163 B [0015]
- WO 201088650 A [0016]
- WO 2010136942 A [0017]
- WO 2010109357 A [0018]

Littérature non-brevet citée dans la description

- **N. FORAY et al.** A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *The EMBO Journal*, 2003, vol. 22 (11), 2860-2871 [0005]
- **JOUBERT 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, vol. 84 (2), 107-125 [0005]
- **N. FORAY.** Les réparatoses : nouveaux concepts sur la prédiction de la radiosensibilité. *Rencontres Nucléaire & Santé*, 25 Janvier 2008 [0005]
- *CHEMICAL ABSTRACTS*, 28718-90-3 [0039]
- Common Terminology Criteria for Adverse Events, appelée en français « Critères d'évaluation de la morbidité selon la classification du National Cancer Institute ». 2006 [0055]
- *CHEMICAL ABSTRACTS*, 9002-93-1 [0086] [0107]
- **A. JOUBERT et al.** DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response : At least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity ?. *International Journal of Radiation Biology*, 2008, vol. 84 (2), 107-125 [0099]

专利名称(译)	确定组织放射敏感性的预测方法		
公开(公告)号	EP3108253B1	公开(公告)日	2019-09-11
申请号	EP2015709256	申请日	2015-02-16
[标]申请(专利权)人(译)	法国国家科学研究中心 CENT LEON BERARD 法国国家健康医学研究院		
申请(专利权)人(译)	Université CLAUDE BERNARD LYON 1 CENTRE 法国国家科学研究 中心 LÉON 贝拉尔 INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE		
当前申请(专利权)人(译)	Université CLAUDE BERNARD LYON 1 CENTRE 法国国家科学研究 中心 LÉON 贝拉尔 INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE		
[标]发明人	FORAY NICOLAS GRANZOTTO ADELIN DEVIC CLEMENT		
发明人	FORAY, NICOLAS GRANZOTTO, ADELIN DEVIC, CLÉMENT		
IPC分类号	G01N33/573 G01N33/68 A61N5/10 A61B5/00 G01N21/25 G01N33/50		
CPC分类号	G01N33/5014 G01N33/5005 G01N33/6881 G01N2333/47 G01N2333/4703 G01N2333/912 G01N2800/52		
代理机构(译)	SCHMIDT , MARTIN PETER		
优先权	2014051216 2014-02-17 FR 2014051215 2014-02-17 FR 2014002281 2014-10-10 FR 2014002282 2014-10-10 FR		
其他公开文献	EP3108253A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种预测细胞，组织和临床放射敏感性的方法，基于几种细胞和酶参数的确定和相关性。

DTND = 60M
 HAZ (4)

SM = 10.5
 HAZ (4)