Analyse de l'Effet Flash in vitro par irradiation proton à ultra haut débit de dose

Kilian Lecrosnier
Centre de Recherche sur les Ions, les Materiaux et la Photonique
Université Caen Normandie, ENSICAEN, CNRS, CEA, CIMAP UMR6252
Caen, France
Kilian.lecrosnier@ganil.fr

Mihaela Temelie
Department of Life and Environmental Physics, Horia Hulubei National Institute for Physics and Nuclear Engineering,
Magurele, Roumanie
mihaela.temelie@nipne.ro

Mihaela Tudor
Department of Life and Environmental Physics, Horia Hulubei National Institute for Physics and Nuclear Engineering,
Magurele, Roumanie
mihaela.tudor@nipne.ro

Mateusz Sitarz
Centre de Recherche sur les Ions, les Materiaux et la Photonique
Université Caen Normandie, ENSICAEN, CNRS, CEA, CIMAP UMR6252
Caen, France
sitarz@lpccaen.in2p3.fr

Mihai Radu
Department of Life and Environmental Physics, Horia Hulubei National Institute for Physics and Nuclear Engineering,
Magurele, Roumanie
mradu@nipne.ro

Diana I. Savu
Department of Life and Environmental Physics, Horia Hulubei National Institute for Physics and Nuclear Engineering,
Magurele, Roumanie
dsavu@nipne.ro

François Chevalier
Centre de Recherche sur les Ions, les Materiaux et la Photonique
Université Caen Normandie, ENSICAEN, CNRS, CEA, CIMAP UMR6252
Caen, France
chevalier@ganil.fr

***Résumé*—La radiothérapie à ultra-hauts débits de dose (UHDR, > 40 Gy/s) suscite un intérêt croissant grâce à son épargne des tissus sains et à son contrôle tumoral inchangé (effet FLASH). Cependant, les mécanismes de l'effet FLASH restent flous. En particulier, peu de données sont disponibles à des débits de dose encore plus élevés, ce qui rend ses bénéfices thérapeutiques potentiels encore inconnus. Dans cette étude, nous étudions le mécanisme de l'effet FLASH en utilisant différents critères d'évaluation in vitro et une large gamme de débits de dose.**

Une lignée cellulaire cancéreuse de carcinome pulmonaire A549, ainsi qu'une lignées cellulaires saines de fibroblaste AG01522 sont utilisées. Des irradiations par faisceau de protons à 17,5 keV/µm ont été réalisées sur un accélérateur Tandetron de 3 MV. Les cellules adhérentes ont été cultivées sur une feuille de mylar de 24 µm et irradiées à des doses allant de 2 Gy à 10 Gy, à des débits de dose allant de 4 Gy/min à 1200 Gy/s. Les critères d'évaluation biologiques comprenaient la survie cellulaire, le cycle cellulaire et la formation d'espèces réactives de l'oxygène.

Les doses et débits de dose les plus élevés ont permis de réduire la survie des cellules cancéreuses. Les cellules saines ont présenté un arrêt en phase du cycle cellulaire G2 plus important que les cellules cancéreuses. La contribution de la phase G2 a augmenté à des doses plus élevées, mais était indépendante du débit de dose. Enfin, dans toutes les lignées cellulaires, la formation d'espèces réactives de l'oxygène la plus élevée a été observée à 4 Gy/min, et a diminué avec les plus hauts du débit de dose. Cependant, les espèces réactives de l'oxygène étaient plus présentes dans les lignées cellulaires saines que dans les lignées cancéreuses.

Cette étude analyse l'effet FLASH in vitro sur des lignées cellulaires pulmonaires et cérébrales. La survie des lignées
cellulaires cancéreuses a diminué en Flash, démontrant un gain thérapeutique potentiellement accru à ce débit de dose. Le cycle cellulaire n'a pas été impacté par le débit de dose, tandis que la formation d'espèces réactives de l'oxygène a diminué avec les hauts débits de dose.

Mots-clés—Radiothérapie Flash ; irradiation proton ; adénocarcinome pulmonaire, ROS mitochondriaux, cycle cellulaire

I. INTRODUCTION

La radiothérapie constitue l'un des piliers du traitement oncologique moderne. Au cours de la dernière décennie, un intérêt croissant s'est porté sur l'irradiation à ultra-haut débit de dose (UHDR, > 40 Gy/s), en raison de son potentiel à préserver les tissus sains tout en maintenant une efficacité antitumorale [1]. Ce phénomène, connu sous le nom d'effet FLASH, a été rapporté principalement dans des modèles précliniques in vivo, avec des bénéfices cliniques encore en cours d'investigation [2]. Toutefois, les mécanismes biologiques sous-jacents demeurent incertains et leur compréhension représente un enjeu majeur pour l'optimisation de cette modalité.

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer l'effet FLASH, notamment une réduction de la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), une modulation de la signalisation cellulaire et des différences dans la réponse au cycle cellulaire entre cellules tumorales et normales. Ces phénomènes pourraient expliquer la sélectivité biologique observée, mais les données in vitro restent limitées, en particulier pour des débits de dose extrêmement élevés.

En parallèle de nos études sur l'installation GANIL avec des hauts débits de dose en ions carbone à haut TEL [3–6], les résultats présentées dans cet article explorent l'utilisation d'irradiations avec des proton à travers une analyse combinée de la survie clonogénique, de la production de ROS mitochondriaux et de la distribution du cycle cellulaire dans différents types cellulaires, issus à la fois de tumeurs (carcinome pulmonaire A549) et de tissus normaux (fibroblastes AG01522). Les cellules ont été soumises à des irradiations avec un faisceau de protons variant de 4 Gy/min (conventionnel) jusqu'à 1500 Gy/s (UHDR).

L'objectif principal de cette étude est de déterminer si l'augmentation du débit de dose influence de façon significative la survie cellulaire, le stress oxydatif et la

régulation du cycle cellulaire, et si ces effets diffèrent selon l'origine tumorale ou saine des cellules. Une attention particulière est portée aux très hauts débits (>1000 Gy/s), rarement étudiés, afin de mieux cerner la fenêtre thérapeutique potentielle du FLASH.

En apportant de nouvelles données quantitatives et comparatives, ce travail contribue à la compréhension mécanistique de l'effet FLASH et à l'évaluation de son intérêt pour de futures applications cliniques en protonthérapie.

II. MÉTHODES

Des irradiations avec un faisceau horizontal de protons de 1,9 MeV ont été réalisées sur un accélérateur Tandetron de 3 MV [7], dans l'Institut de physique de Magurele, Horia Hulubei National Institute for Physics and Nuclear Engineering, Magurele, en Roumanie (Figure 1). Les cellules adhérentes ont été cultivées sur une feuille de mylar de 24 µm afin de permettre une irradiation homogène et contrôlée. Les doses délivrées variaient de 2 à 10 Gy, selon trois régimes de débits, à 4 Gy/min (irradiation conventionnelle, CONV), à 50 Gy/s (UHDR intermédiaire), et à 1200–1500 Gy/s (UHDR extrême). Le champ de rayonnement a été vérifié à l'aide de films gafchromiques et d'une chambre de Markus (Figure 1).

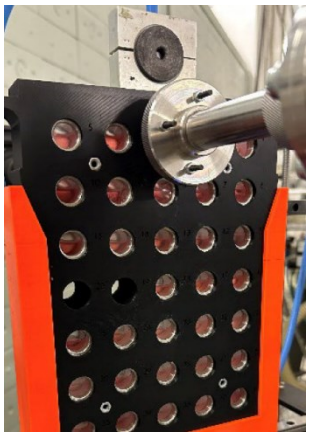

Figure 1: set-up pour les irradiation de cellules sur feuille de Mylar

Le dépôt de dose en profondeur ainsi que le transfert d'énergie linéique (LET) ont été calculé afin d'optimiser les irradiations (Figure 2).

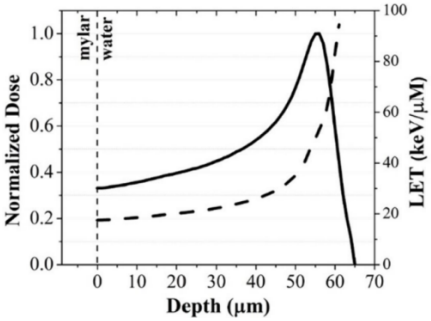

Figure 2: dépôt de dose et TEL en fonction de la profondeur de l'eau après le mylar

Plusieurs lignées cellulaires ont été sélectionnées afin de comparer des phénotypes tumoraux et sains: A549 (adénocarcinome pulmonaire), AG01522 (fibroblastes normaux).

Trois paramètres biologiques ont été évalués 24 h après irradiation:

- Survie clonogénique :

Des tests clonogéniques standard ont été réalisés pour mesurer la capacité de prolifération des cellules après irradiation. La survie a été exprimée en fonction de la dose et du débit de dose.

- Formation de ROS mitochondriaux

Les espèces réactives de l'oxygène ont été quantifiées par cytométrie en flux à l'aide du marqueur MitoSOX (405 nm). Les comparaisons ont été effectuées entre cellules tumorales et saines, à différentes doses et débits de dose.

- Cycle cellulaire

L'analyse des phases du cycle cellulaire a été effectuée par coloration Hoechst 33342 et cytométrie en flux. La distribution des populations en phases G1, S et G2/M a été comparée selon les conditions d'irradiation.

III. RÉSULTATS

A. Analyse de la survie cellulaire après irradiations

Les résultats montrent une réduction significative de la survie des cellules tumorales en fonction de la dose, mais avec un effet identique entre les deux débits de doses utilisés (Fig. 3); les deux courbes de survie cellulaire sont quasiment superposées, quelque soit la dose utilisée et le débit de dose appliqué.

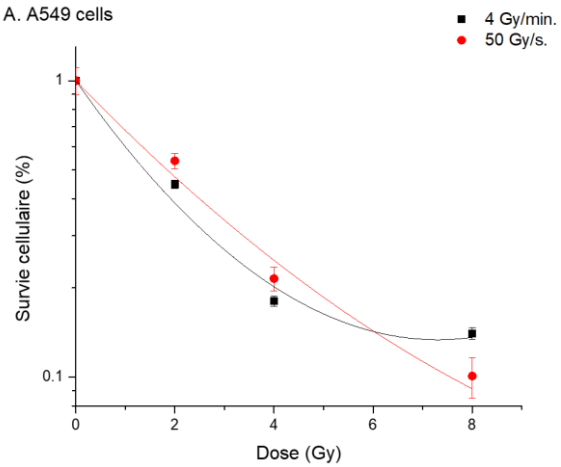

Figure 3: survie cellulaire de la lignée cellulaire de cancer du poumon A549 irradiée avec des protons à 4 Gy/min (noir) ou à 50 Gy/s (rouge).

En revanche, pour les cellules AG0-1522 (fibroblastes normaux), on note un effet protecteur à haut débit de dose. La survie des cellules diminue avec la dose pour le débit de dose de 4 Gy/min pour passer de 100 % (0 Gy) à environ 30 % (8 Gy). Alors que pour les irradiations réalisées à 50 Gy/s, la survie cellulaire à 8 Gy reste proche de 80 %. Ce contraste suggère une sélectivité en faveur des tissus sains, conforme à l'hypothèse de l'effet FLASH (Figure 4).

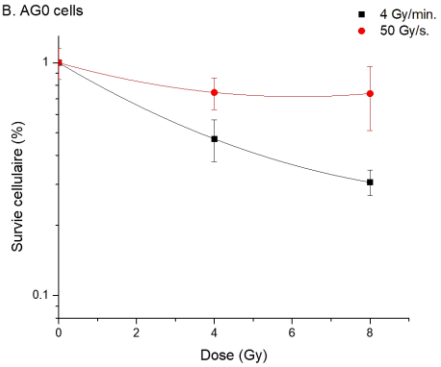

Figure 4: survie cellulaire de la lignée cellulaire de fibroblaste AG0-1522 irradiée avec des protons à 4 Gy/min (noir), 50 Gy/s (rouge).

B. *Quantification des ROS mitochondriaux*

La quantification des ROS révèle une tendance nette : la production de ROS est maximale à 4 Gy/min et diminue progressivement à mesure que le débit augmente. De plus, les cellules normales (AG01522) présentent une accumulation de ROS plus importante que les cellules tumorales (A549), indépendamment de la dose (Figure 5 et 6). Cette observation suggère une modulation oxydative dépendante du débit, possiblement liée à un métabolisme de l'oxygène et des ROS différent en UHDR.

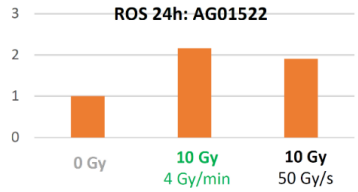

Figure 5: quantification des ROS mitochondriaux dans la lignée cellulaire saine AG0-1522 irradiée avec des protons à 4 Gy/min (vert) et 50 Gy/s (noir).

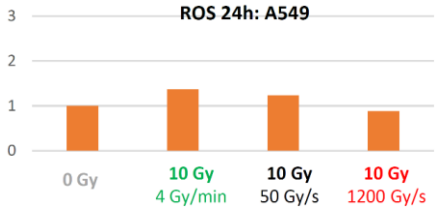

Figure 6: quantification des ROS mitochondriaux dans la lignée cellulaire de cancer du poumon A549, irradiée avec des protons à 4 Gy/min (vert), 50 Gy/s (noir) ou à 1500 Gy/s (rouge).

C. *Analyse du cycle cellulaire*

L'analyse du cycle cellulaire montre que les cellules normales (Figure 7) présentent un arrêt en phase G2 plus marqué que les cellules tumorales (Figure 8).

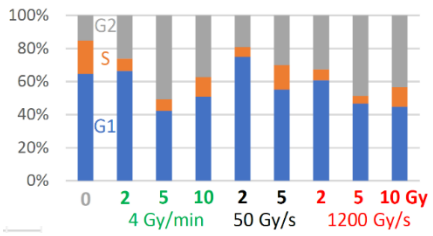

Figure 7: quantification du cycle cellulaire dans la lignée cellulaire saine AG0-1522 irradiée avec des protons à 4 Gy/min (vert), 50 Gy/s (noir) ou à 1500 Gy/s (rouge).

Toutefois, cette redistribution n'est pas dépendante du débit de dose mais plutôt de la dose totale. Ainsi, la proportion de cellules en G2 augmente avec la dose, sans différence notable entre CONV, 50 Gy/s et 1200 Gy/s. Les cellules A549 affichent une réponse moins prononcée, suggérant une moindre capacité de checkpoint et de réparation.

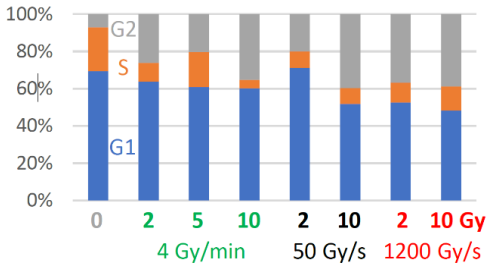

Figure 8: quantification du cycle cellulaire dans la lignée cellulaire de cancer du poumon A549, irradiée avec des protons à 4 Gy/min (vert), 50 Gy/s (noir) ou à 1500 Gy/s (rouge).

IV. DISCUSSION

Les résultats obtenus s'inscrivent dans la continuité des observations précliniques concernant l'effet FLASH. Plusieurs études antérieures avec des électrons ont rapporté une réduction des lésions tissulaires normales à UHDR, attribuée à une moindre production de ROS et à une protection micro-environnementale [2,8]. Nos données en irradiation proton confirment que la formation de ROS diminue avec l'augmentation du débit de dose, suggérant un métabolisme des ROS différentiel et à une moindre peroxydation dans les tissus sains [9–11].

La sélectivité observée sur la survie clonogénique entre cellules tumorales et normales est particulièrement notable. Elle rejoint de précédents travaux, qui avaient montré une meilleure tolérance pulmonaire à UHDR in vivo [12]. Ces résultats ouvrent des perspectives pour optimiser les protocoles de protonthérapie FLASH [13].

En revanche, l'absence d'effet dose-débit sur le cycle cellulaire nuance les hypothèses d'une régulation spécifique de checkpoints par l'UHDR. La redistribution observée en G2 semble essentiellement dépendre de la dose, conformément aux modèles classiques de dommages à l'ADN et d'activation de p53. Cela suggère que le cycle cellulaire n'est pas le principal médiateur de l'effet FLASH in vitro.

V. CONCLUSION

En conclusion, cette étude démontre que les irradiations à haut débit de dose avec des proton permettent de réduire la survie clonogénique des cellules tumorales tout en épargnant les cellules normales, la diminution des ROS avec l'augmentation du débit pourrait expliquer ce différentiel, le cycle cellulaire ne semble pas influencé par le débit de dose, mais plutôt par la dose totale.

Ces résultats renforcent l'hypothèse d'un bénéfice thérapeutique du FLASH en protonthérapie, tout en soulignant la nécessité d'études mécanistiques plus approfondies pour relier stress oxydatif, réparation de l'ADN et microenvironnement tissulaire.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Ministère Roumain de la Recherche, de l'Innovation et de la Numérisation, le contrat PN-IV-P8-8_3-PM-RO-FR-2024-0104 4BMFR/2024 et le Programme « Nucleu » PN 23210202 pour leur soutien.

Nous tenons aussi à remercie le Partenariat Hubert Curien (PHC) Brancusi 2024, projet n° 51825XA "INnovative CanceR trEatment by flaSh radiothErapy" et le PHC Brancusi 2019, Projet n° 43535RF "FIDIA2C".

RÉFÉRENCES

[1] Favaudon, V.; Caplier, L.; Monceau, V.; Pouzoulet, F.; Sayarath, M.; Fouillade, C.; Poupon, M.-F.; Brito, I.; Hupé, P.; Bourhis, J.; et al.

Ultrahigh Dose-Rate FLASH Irradiation Increases the Differential Response between Normal and Tumor Tissue in Mice. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 245ra93-245ra93, doi:10.1126/scitranslmed.3008973.

[2] Bourhis, J.; Sozzi, W.J.; Jorge, P.G.; Gaide, O.; Bailat, C.; Duclos, F.; Patin, D.; Ozsahin, M.; Bochud, F.; Germond, J.-F.; et al. Treatment of a First Patient with FLASH-Radiotherapy. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **2019**, *139*, 18–22, doi:10.1016/j.radonc.2019.06.019.

[3] Sitarz, M.; Lecrosnier, K.; Doublet, Y.; Fontbonne, J.-M.; Méry, A.; Rousseau, M.; Vizcaino, V.; Chevalier, F. Effet Protecteur Du FLASH in Vitro En Fonction de La Lignée Cellulaire, de La Concentration En Oxygène et Du TEL Des Ions Carbone. In Proceedings of the 2ème congrès de radiobiologie de la Société Française de Biologie des Radiations; SFBR: Porquerolles (Var), France, October 2024.

[4] Sitarz, M.; Lecrosnier, K.; Doublet, Y.; Fontbonne, J.-M.; Méry, A.; Rousseau, M.; Vizcaino, V.; Chevalier, F. Investigation of Flash Effect in Vitro Using Healthy and Tumor Cells with Carbon Ions at GANIL. In Proceedings of the FRPT 2024; Rome, December 2024.

[5] Lecrosnier, K.; Sitarz, M.; Amakkattu, J.B.; Doublet, Y.; Fontbonne, J.-M.; Guillamin, M.; Méry, A.; Rousseau, M.; Vizcaino, V.; Chevalier, F. Oxygen Influence on Cell Response to 12C-FLASH. In Proceedings of the FLASH Workshop 2025: The Role of Oxygen in FLASH Radiation Therapy; Heidelberg, July 1 2025.

[6] Sitarz, M.; Lecrosnier, K.; Babu Amakkattu, J.; Doublet, Y.; Fontbonne, J.-M.; Méry, A.; Rousseau, M.; Chevalier, F. Radiothérapie FLASH Avec Des Ions Carbone: Premières Études Mécanistiques in Vitro Au GANIL. In Proceedings of the 17 èmes Journées scientifiques annuelles du Cancéropôle Nord-Ouest 2025; Cancéropôle Nord-Ouest: Deauville, France, May 2025.

[7] Straticiuc, M.; Bacalum, M.; Mircea Rusu, C.; Andrei, R.; Burducea, I.; Cenusa, I.; Cenusa, C.; Dinescu, I.; Dirleci, S.; Enciu, A.; et al. New Setup for Basic Radiobiology Studies Using a 3 MV TandetronTM: Design and Developments. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.* **2022**, *528*, 45–53, doi:10.1016/j.nimb.2022.08.001.

[8] Vozenin, M.-C.; De Fornel, P.; Petersson, K.; Favaudon, V.; Jaccard, M.; Germond, J.-F.; Petit, B.; Burki, M.; Ferrand, G.; Patin, D.; et al. The Advantage of FLASH Radiotherapy Confirmed in Mini-Pig and Cat-Cancer Patients. *Clin. Cancer Res.* **2019**, *25*, 35–42, doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-3375.

[9] Chow, J.C.L.; Ruda, H.E. Mechanisms of Action in FLASH Radiotherapy: A Comprehensive Review of Physicochemical and Biological Processes on Cancerous and Normal Cells. *Cells* **2024**, *13*, 835, doi:10.3390/cells13100835.

[10] Scarmelotto, A.; Delprat, V.; Michiels, C.; Lucas, S.; Heuskin, A.-C. The Oxygen Puzzle in FLASH Radiotherapy: A Comprehensive Review and Experimental Outlook. *Clin. Transl. Radiat. Oncol.* **2024**, *49*, 100860, doi:10.1016/j.ctro.2024.100860.

[11] Wilson, J.D.; Hammond, E.M.; Higgins, G.S.; Petersson, K. Ultra-High Dose Rate (FLASH) Radiotherapy: Silver Bullet or Fool's Gold? *Front. Oncol.* **2020**, *9*, 1563, doi:10.3389/fonc.2019.01563.

[12] Favaudon, V.; Caplier, L.; Monceau, V.; Pouzoulet, F.; Sayarath, M.; Fouillade, C.; Poupon, M.-F.; Brito, I.; Hupé, P.; Bourhis, J.; et al. Ultrahigh Dose-Rate FLASH Irradiation Increases the Differential Response between Normal and Tumor Tissue in Mice. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 245ra93, doi:10.1126/scitranslmed.3008973.

[13] Lv, Y.; Lv, Y.; Wang, Z.; Lan, T.; Feng, X.; Chen, H.; Zhu, J.; Ma, X.; Du, J.; Hou, G.; et al. FLASH Radiotherapy: A Promising New Method for Radiotherapy (Review). *Oncol. Lett.* **2022**, *24*, 1–14, doi:10.3892/ol.2022.13539

.

CHAPITRE 5

LANGUES ET DIDACTIQUES DU FLE