



Implication de la paraoxonase 1 dans la réponse des lymphocytes à l'irradiation

Ariane Lapierre

► To cite this version:

Ariane Lapierre. Implication de la paraoxonase 1 dans la réponse des lymphocytes à l'irradiation. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2020. Français. NNT : 2020MONTT026 . tel-03145336

HAL Id: tel-03145336

<https://theses.hal.science/tel-03145336>

Submitted on 18 Feb 2021

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

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

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Cancérologie

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la santé (CBS2)

Unité de recherche INSERM U1194

Implication de la paraoxonase 1 dans la réponse des lymphocytes à l'irradiation

Présentée par Ariane LAPIERRE

Le 16 novembre 2020

Sous la direction de David AZRIA
et Muriel BRENGUES

Devant le jury composé de

M Stéphane SUPIOT, Pr, Institut de Cancérologie de l'Ouest

M Christophe HENNEQUIN, Pr, Hôpital Saint-Louis

Mme Claire RODRIGUEZ-LAFRASSE, Pr, Université de Lyon 1, UMR CNRS5822/IN2P3

M Eric DEUTSCH, Pr, Institut Gustave Roussy

M Mahmut OZSAHIN, Pr, Centre Hospitalier Universitaire de Lausanne

M David AZRIA, Pr, Institut du Cancer de Montpellier

Mme Muriel BRENGUES, Dr, Inserm U1194

President du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Co-directrice de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Table des matières

Table des matières	5
Table des figures	8
Liste des abbreviations.....	10
Introduction	12
Partie 1 : La radiothérapie et ses toxicités.....	13
La radiothérapie – Généralités	13
Les toxicités de la radiothérapie	13
Développement des tests de radiosensibilité individuelle	15
Improving patients' life quality after radiotherapy treatment by predicting late toxicities	16
RILA – conclusion	34
Partie 2 : PON1	35
PON1 : découverte et caractéristiques	35
Activités enzymatiques de PON1	36
Données animales sur le rôle de PON1.....	37
PON2 et PON3.....	38
Polymorphisme de PON1	39
PON1 et clinique	40
PON1 et cancer	42
Objectifs.....	45
Matériel et méthodes	48
Lignées cellulaires.....	48
Isolation des lymphocytes T humains et des cellules sanguines mononucléées (PBMC).....	48
Protocole d'irradiation.....	49
Extraits protéiques et surnageants des lymphocytes T	49
Extraction de l'ARN des lymphocytes T	50
Test RILA	50
Analyse du cycle cellulaire	51
Analyse de l'apoptose, test Annexin V - 7AAD, par cytométrie en flux.....	51

Mesure indirecte des ROS	53
Etude de la signalisation par Western blot.....	53
Mesure de l'expression de PON1 par ELISA.....	55
Etude de l'expression de l'ARN messager de PON1 et CHK1 par RT-qPCR.....	55
Activation des PBMC et des lymphocytes T <i>in vitro</i>	57
Isolation des cellules	57
Activation des cellules.....	58
Analyse du cycle cellulaire des PBMC et des lymphocytes T	58
Analyse statistique	58
Résultats et discussion	60
Partie 1 : Résultats préliminaires.....	60
1.1 Le RILA est modifié par des facteurs présents dans le surnageant lymphocytaire.....	60
1.2 PON1 est associé aux patients présentant un RILA faible	61
1.3 PON1 est exprimé et sécrété par les lymphocytes T	62
1.3.1 Expression basale	62
1.3.2 Expression après irradiation.....	62
1.4 Conclusion des résultats de cette partie	64
Partie 2 : Développement du modèle cellulaire.....	65
2.1 Mise au point du RILA sur les lignées cellulaires	65
2.1.1 Choix du modèle cellulaire	65
2.1.2 « RILA » cellulaire	65
2.1.3 Analyse directe de l'apoptose	66
2.2 Modulation de l'expression de PON1 dans les lignées cellulaires.....	68
2.2.1 Construction des lignées exprimant PON1.....	68
2.2.2 Etude de différents clones : expression de PON1 et apoptose radio-induite.....	69
2.2.3 Analyse du stress oxydant dans les clones transfectés.....	70
2.2.4 Etude mécanistique des clones transfectés.....	72
2.2.5 Construction des lignées déplétées en PON1	73
2.3 Conclusion des résultats de cette partie	74
Partie 3 : Données humaines.....	75
3.1 Validation des résultats préliminaires	75
3.1.1 Expression et sécrétion de PON1 dans les lymphocytes T	75
3.1.2 Corrélation entre le taux de PON1 lymphocytaire et le RILA.....	77
3.2 L'expression de PON1 est corrélée à celle de Chk1	78

3.2.1 Analyse en WB dans les lymphocytes T.....	78
3.2.2 Analyse en WB dans les PBMC	79
3.2.3 Analyse par qPCR.....	80
3.3 Corrélation de l'expression de PON1 à d'autres voies de signalisations.....	82
3.4 Stabilité de l'expression de PON1 dans le temps	83
3.4.1 Perte de l'expression de PON1 chez les patients	83
3.4.2 Activation des lymphocytes et induction de l'expression de PON1.....	85
3.5 Conclusion des résultats de cette partie	87
Conclusion et perspectives	89
Références bibliographiques	95
Publications annexes.....	103

Table des figures

Figure 1 : Structure tridimensionnelle de PON1. D'après de Harel et al. (Harel et al., 2004)	35
Figure 2 : Action des paraoxonases dans l'athérome. Reproduit à partir de Chistiakov et al. (Chistiakov et al., 2017)	41
Figure 3 : Plasmide pLenti CMV Puro DEST utilisé pour les transfections stables	52
Figure 4 : Analyse des facteurs influençant le résultat du RILA	60
Figure 5 : Analyse par spectrométrie de masse des échantillons de surnageant lymphocytaire de patients.....	61
Figure 6 : Expression de PON1 par les lymphocytes T humains	62
Figure 7 : Expression de PON1 par les lymphocytes T humains après irradiation	63
Figure 8 : Expression de PON1 par les lignées cellulaires	65
Figure 9 : « RILA » cellulaire	66
Figure 10 : Comparaison du test Annexin V - 7AAD et de l'analyse du cycle cellulaire sur les lignées Jurkat et HPB-ALL	67
Figure 11 : Expression de PON1 par les cellules Jurkat transfectées.....	68
Figure 12 : Etude des clones Jurkat-PON.....	69
Figure 13 : Impact de la N-acétyl-cystéine sur l'apoptose radio-induite dans les lignées Jurkat	71
Figure 14 : Analyse des voies de signalisations radio-induites	73

Figure 15 : concentration de PON1 dans le plasma et dans le surnageant lymphocytaire de patients.....	75
Figure 16 : Concentration de PON1 par les lymphocytes T humains après irradiation	76
Figure 17 : Corrélation entre concentration de PON1 dans le surnageant lymphocytaire et RILA	77
Figure 18 : Expression de PON1 et Chk1 dans les lymphocytes T humains sur 2 séries de patients	78
Figure 19 : Expression de PON1 et Chk1 dans les PBMC de patients	79
Figure 20 : Analyse de PON1, CHK1 et ATR en RT-qPCR et comparaison avec l'analyse WB	81
Figure 21 : Expression de différentes protéines impliquées dans la réponse à l'irradiation dans les lymphocytes T	82
Figure 22 : Expression de PON1 dans les lymphocytes T de patients.....	84
Figure 23 : Analyse du cycle cellulaire des PBMC et des lymphocytes T activés	86
Figure 24 : Voies de signalisations et réparation de l'ADN après irradiation : implication de Chk1 et Chk2. Reproduit à partir de Carrassa et al. (Carrassa and Damia, 2017)	92

Liste des abbreviations

ATM : ataxia telangiectasia mutated protein

ATR : ataxia telangiectasia and Rad3-related protein

apo : apolipoprotéine

CMV : cytomegalovirus

ELISA : Enzyme-Linked Immuno Assay

GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

HDL : High-density lipoprotein

HRP : horseradish peroxydase

kDa : kilo Dalton

KO : knock-out

LDL : Low-density lipoprotein

MPO : myélopéroxydase

NAC : N-acétyl-cystéine

PBMC : Peripheral Blood Mononucleated Cells

PON : Paraoxonase

ROS : Reactive Oxygen Species

RT-qPCR : Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction

rpm : rotations par minute

SVF : Sérum de Veau Fœtal

WB : Western blot

WT: wild type

Introduction

Ce travail de thèse a été réalisé à l'Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRCM), sous la direction du Pr David AZRIA et du Dr Muriel BRENGUES, dans l'équipe Immunociblage et Radiobiologie en Oncologie dirigée par le Dr André Pèlegri.

L'objectif de cette thèse a été de rechercher un rationnel moléculaire et cellulaire aux résultats du test d'apoptose lymphocytaire radio-induite (RILA) développé à la fin des années 1990 par le Pr Ozsahin. En effet, si les résultats cliniques de ce test permettent d'établir en lien entre son résultat et le risque de développer des effets secondaires tardifs après la radiothérapie externe, les mécanismes expliquant pourquoi la réponse des lymphocytes circulants à l'irradiation reproduit la réponse des tissus sains restent inconnus.

Des résultats préliminaires obtenus dans notre équipe semblent montrer que ces mécanismes pourraient faire intervenir des facteurs sécrétés par les lymphocytes. Le but de ce travail de thèse a donc été d'étudier ces facteurs et leur implication dans la réponse à l'irradiation des lymphocytes. Pour ce faire, nous avons tenté de mettre en place des modèles *in vitro* du RILA afin d'en explorer les mécanismes. Enfin, nous avons également recherché des corrélations entre l'expression de ces facteurs et le score RILA des patients.

Partie 1 : La radiothérapie et ses toxicités

La radiothérapie – Généralités

La radiothérapie externe est un traitement basé sur l'utilisation de rayonnements ionisants provenant d'une source externe au patient pour traiter des tumeurs. Sa première utilisation remonte à la fin du XIXe siècle par Emil Grubbe, et la première publication de 1896, par Victor Despeignes (Despeignes, 1896). A l'époque, la source radioactive utilisée était le radium, qui était mis directement au contact de la peau du patient.

L'utilisation des rayons X a rapidement suivi, 1900, avec l'utilisation, à l'époque, de tubes de Coolidge pour produire les rayonnements ionisants.

Les accélérateurs linéaires et donc la radiothérapie moderne sont apparus dans les années 1970. Dans ces accélérateurs, des électrons sont émis par le chauffage d'un filament d'un canon à électrons. Leur énergie est ensuite augmentée dans la section accélératrice de l'accélérateur. Ils sont ensuite projetés sur une cible en tungstène afin d'obtenir un rayonnement de freinage constitué de rayons X. C'est ce type de rayonnement qui est le plus souvent utilisé en radiothérapie externe (bien que les électrons puissent être utilisés dans certaines situations).

La radiothérapie est un traitement localisé et non invasif des cancers. Son utilisation est extrêmement fréquente et on estime que plus de la moitié des patients pris en charge pour une tumeur solide auront de la radiothérapie à une phase de leur prise en charge (Delaney et al., 2005). En France, cela représente près de 200 000 patients et 4 millions de séances par an (données INCa).

Les toxicités de la radiothérapie

Les effets secondaires de la radiothérapie sont regroupés dans 2 catégories : les effets secondaires dits aigus survenant pendant le traitement ou dans les 3 mois suivant celui-ci, et les effets secondaires dits tardifs, survenant plus de 3 mois après la fin du traitement. De façon générale, la dose prescrite en radiothérapie et les contraintes appliquées aux organes à risque dépend du pronostic de la tumeur traitée, mais a pour but de limiter le risque d'effets secondaires sévères (grade ≥ 3) inférieur à 5% (Bentzen et al., 2010; Emami et al., 1991). Cependant, même en respectant ces contraintes, 5 à 10% des patients vont développer des effets secondaires sévères.

Si les toxicités aiguës sont généralement transitoires et peuvent être prises en charge par des traitements symptomatiques, les toxicités tardives peuvent persister à long terme et avoir un impact significatif sur la qualité de vie des patients. La survenue d'effets secondaires aigus ne prédispose pas à la survenue d'effets secondaires tardifs, hormis le développement de toxicité aiguë sévère (grade $\geq$ 3) qui peut parfois subsister par des complications tardives (par exemple, télangiectasies secondaires à une épidermite de grade 3) (Bentzen and Overgaard, 1991). Ainsi, l'identification en amont du traitement des patients présentant un surrisque de toxicité tardive est cruciale afin de limiter la survenue d'effets secondaires potentiellement invalidants (Barnett et al., 2009).

La première description clinique de radiosensibilité individuelle a été faite en 1936 par Holthusen (Holthusen, 1936). La première mise en évidence *in vitro* d'une sensibilité accrue a, quant à elle, été décrite en 1975 sur des fibroblastes de patients atteints d'ataxie télangiectasie (Taylor et al., 1975). En effet, en irradiant *in vitro* des fibroblastes de patients sains et de patients atteints d'ataxie télangiectasie, Taylor a pu montrer que les toxicités cliniques présentées par les patients après radiothérapie étaient liées à une différence de radiosensibilité à l'échelle cellulaire.

De nombreux facteurs de risque participant au développement d'effets secondaires radio-induits tardifs sont décrits : âge, comorbidités (pathologies de la microvascularisation, collagénose, etc...), chimiothérapie ou hormonothérapie concomitante, antécédent de chirurgie, radiosensibilité intrinsèque. Cette radiosensibilité intrinsèque n'est pas le produit d'une altération génétique unique, il s'agit plutôt d'un phénotype complexe dont l'origine et les mécanismes restent à ce jour méconnus (Andreassen et al., 2002). Cependant, l'identification de patients « hyper-réactifs » permettrait de proposer un traitement individualisé basé sur la susceptibilité individuelle : pour ces patients à haut risque de toxicités radio-induites, des schémas thérapeutiques alternatifs (chirurgie radicale) ou adaptation des modalités d'irradiation (diminution de la dose totale, fractionnement adapté, etc...) pourraient être proposés. A l'inverse, les patients à faible risque de toxicité radio-induite pourraient bénéficier d'une intensification du traitement, permettant d'améliorer le contrôle local, sans pour autant majorer le risque d'effets secondaires.

Ces dernières années, de plus en plus de sociétés savantes se sont prononcées en faveur de la recherche et l'identification de ces patients en routine clinique, afin de proposer un traitement personnalisé et une médecine de précision (Hall et al., 2018).

Développement des tests de radiosensibilité individuelle

La première recherche à large échelle de facteurs de radiosensibilité individuelle a été réalisée dans les années 1970 par Turesson (Turesson et al., 1996). Cependant, les résultats de cette étude ne permettaient que d'expliquer 30% des toxicités sévères, laissant la majorité de ces effets inexpliqués.

Plus récemment, dans les années 2000, plusieurs profils génétiques de radiosensibilité *in vitro* ont été identifiés (Torres-Roca et al., 2005; Eschrich et al., 2009). Il semblerait que les polymorphismes de base (single nucleotide polymorphisms ou SNPs), et les profils génomiques conditionnant l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose radio-induite soient la meilleure façon de classer les patients en terme de risque de toxicité radio-induite (Hall et al., 2018; Mayer et al., 2011).

De nombreuses équipes ont essayé de mettre au point des tests *in vitro* permettant de prédire le risque de toxicité après radiothérapie. A ce jour, le seul test ayant montré des résultats dans une étude prospective et multicentrique est le test d'apoptose lymphocytaire radio-induite ou RILA (Ozsahin et al., 1997).

Un résumé de son développement et des principaux résultats cliniques est disponible dans la revue ci-après.

Improving patients' life quality after radiotherapy treatment by predicting late toxicities

Ariane Lapierre^{1,2}, Laura Bourillon¹, Marion Larroque¹, Céline Bourcier¹, Mahmut Ozsahin³, André Pèlerin¹, David Azria¹, Muriel Brengues¹

¹IRCM, INSERM, Univ Montpellier, ICM, Montpellier, France.

²Department of Radiotherapy-Oncology, Lyon-Sud Hospital Center, Pierre-Bénite, France

³CHU Vaudois, Lausanne, Switzerland.

Revue soumise à Practical Radiation Oncology

Improving patients' life quality after radiotherapy treatment by predicting late toxicities

Ariane Lapierre^{1,2}, Laura Bourillon¹, Marion Larroque¹, Céline Bourcier¹, Mahmut Ozsahin³, André Pèlegri¹, David Azria¹, Muriel Brengues¹

¹IRCM, INSERM, Univ Montpellier, ICM, Montpellier, France.

²Department of Radiotherapy-Oncology, Lyon-Sud Hospital Center, Pierre-Bénite, France

³CHU Vaudois, Lausanne, Switzerland.

Abstract

Personalized treatment and precision medicine have become the new standard of care in oncology and radiotherapy. Because treatment outcome has considerably improved over the last few years, permanent side-effects are becoming an increasingly significant issue for cancer survivors. Five to ten percent of patients will develop severe late toxicity after radiotherapy. Identifying these patients before treatment start would allow for treatment adaptation to minimize definitive side effects that could impair their long-term quality of life. Over the last decades, several tests and biomarkers have been developed to identify these patients. However, out of these, only the Radiation-Induced Lymphocyte Apoptosis (RILA) assay has been prospectively validated in multi-center cohorts. This test, based on a simple blood draught, has been shown to be correlated with late radiation-induced toxicity in breast, prostate, cervical and head and neck cancer. It could therefore greatly improve decision making in precision radiation oncology.

This literature review summarizes the development and bases of this assay, as well as its clinical results and compares its results to the other available assays.

Introduction

Radiotherapy is one of the leading treatment modalities in oncology. Over 50% of patients will receive radiotherapy at some point of their treatment course. Although it is a locoregional

treatment, patients can exhibit toxicities in the treatment field or in the surrounding tissues. These toxicities can be defined either as early (occurring during or in the 3 months after treatment completion) or late (occurring more than 3 months after treatment completion).

Depending on the prognosis and tumor type, the prescription dose and constraints to organs-at-risk are usually chosen in order to keep the risk of developing grade 3 or higher side effects below 5%. However, even when keeping these constraints, 5 to 10% of patients will develop severe toxicities after radiotherapy. These patients can be considered intrinsically radiosensitive.

The first clinical observation of individual radiosensitivity was described by Holthusen in 1936, whereas the first *in vitro* display of individual radiosensitivity was shown on fibroblasts of ataxia telangiectasia patients in 1975 (1).

Early toxicities can usually be managed using symptomatic treatments and will most of the time resolve after treatment completion. On the other hand, late toxicities can be definitive, and severely impact quality of life, sometimes requiring extensive treatments such as surgery to alleviate the symptoms. Based on these observations, it appears crucial to identify the patients at risk of developing severe late toxicities early on, because severe toxicities in a minority of patients limit the dose for the majority of patients. Furthermore, these patients need to be identified before treatment start, because acute toxicities may not always predict late toxicities (2).

The first large scale clinical search of individual factors of radiosensitivity was performed in the 1970's by Turesson et al (3). However, in this study, clinical factors and early toxicities only explained 30% of late toxicities, leaving 70% unexplained. Although influenced by many exogenous factors (such as smoking habits, age or ongoing treatments), it seems rather unlikely that individual radiosensitivity should be caused by only one intrinsic factor. It seems reasonable to assume that clinical radiosensitivity should be regarded as a complex trait depending on the combined effect of several different genetic alterations.

Should these genetic traits be successfully found, early identification of patients at risk of severe late toxicities could allow physicians to suggest a more appropriate treatment course (such as radical mastectomy instead of conservative breast surgery) in cases where the risk of toxicity outweighs the benefits of the radiation treatment (4). In the near future, this could

lead to tailored treatment based on the risk profile of each patient, adapting treatment dose or technique to each individual situation.

More recently, in the 2000's, several genetic profile studies have come up with gene expression models linked to tumor radiosensitivity *in vitro* (5). When looking at healthy tissue toxicities, genomic signatures, single nucleotide polymorphisms (SNPs) variability, or apoptosis or cell cycle regulating genes expression changes after irradiation appear to have better potential at classifying patients (6).

Even though it has been widely discussed for over 20 years, the American Society for Radiation Oncology (ASTRO), the American Association of Physicists in Medicine (AAPM) and the National Cancer Institute (NCI) have recently established guidelines on precision medicine in radiotherapy (6). Their conclusion is that genomically guided radiation therapy is a necessity that must be embraced in the coming years, to improve outcomes for numerous cancer patients. However, routine genomic signature and clinical tests still need to be brought into routine standard of care.

Development of the Radiation-Induced Lymphocyte Apoptosis (RILA) assay

The first correlation between *in vitro* assays and clinical findings was done using skin fibroblasts of ataxia telangiectasia patients (1). In this study, the authors observed a difference in *in vitro* response to radiotherapy of primary fibroblast cultures between ATM-mutated patients and healthy controls, showing that *in vitro* observation could translate to the clinic. Further studies, based on colony-forming assays or surviving fraction at 2 Gray (Gy) (SF2) showed a strong relation between fibroblast sensitivity *in vitro* and normal-tissue reactions, both acute effects and late fibrosis (7).

However, although these results were promising, both studies were performed on small groups of patients (respectively 6 and 12 patients), and further validation on larger cohorts was needed to confirm these observations. Unfortunately, when performed on a larger group (79 patients), no significant correlation between fibroblast radiosensitivity and fibrosis could be found, because of significant inter-patient variation for SF2 values (over 40%) (8).

Other fibroblast-based assays such as comet assays or micronuclei formation were investigated (9,10). However, in both cases, despite promising results in small study groups, no significant correlation was found between these *in vitro* tests and patient radiosensitivity in larger cohorts (11).

Based on these observations, and given the fact that fibroblast radiosensitivity assays have a long completion time (over one month), a simpler and more reliable *in vitro* assay was needed.

Since fibroblasts assays were rather time-consuming, researchers turned to easily available cells: peripheral blood mononucleated cells (PBMCs). Out of these PBMCs, lymphocytes were soon selected as a study model because of their higher radiosensitivity compared to other cell types.

The first studies investigating peripheral lymphocytes irradiation gave inconsistent results (12). Although comparing cell survival after irradiation, irradiation was done at low-dose rate in all three studies. Lacking a clear standard for their tests, inter-patient and intra-patient variations were very high and no correlation to the clinic could be found because of the lack of reproducibility.

High dose-rate irradiation for *in vitro* studies started to develop in the 1990's. At first, the assays used were the same as the fibroblast-based assays: colony formation, SF2, comet and micronuclei assays. Once again using ataxia telangiectasia patients, West et al showed that peripheral blood lymphocytes from patients who suffered severe reactions to radiotherapy were more radiosensitive than those from normal donors (13). However, micronuclei assays data showed large discrepancies between studies and no clear conclusion could be made (14). The same goes for comet assays: although the test could identify patients with defective *in vitro* DNA repair mechanisms, no correlation could be made between these findings and radiation-induced toxicities in patients (15).

However, analysis of lymphocyte apoptosis after irradiation showed a different response to radiotherapy in patients with genetic disorders such as ataxia telangiectasia or neurofibromatosis when compared to healthy counterparts (16).

Apoptosis may not be the predominant death type after radiotherapy in most cancer cell lines; however, it is much more frequent in hematopoietic cell lines such as peripheral lymphocytes. This particular cell death mechanism occurs rapidly after irradiation (6 to 72 hours) and can

be easily detected by flow cytometry. Therefore, in the 1990's, Ozsahin et al. developed a rapid assay to detect peripheral lymphocyte apoptosis after irradiation (17). This assay was based on the analysis of apoptosis of both CD4 and CD8 T-lymphocytes 48 hours after 8 Gy irradiation. The result was given as a percentage of apoptosis at 8 Gy, subtracting the apoptosis at 0 Gy (non-irradiated samples) as a control (**Figure 1**). CD4 and CD8 T-lymphocytes apoptosis was correlated in all adult donors, and inter-donor variations were higher than intra-donor variations, displaying a good reproducibility of this assay. This was later named the radiation-induced lymphocyte apoptosis (RILA) assay.

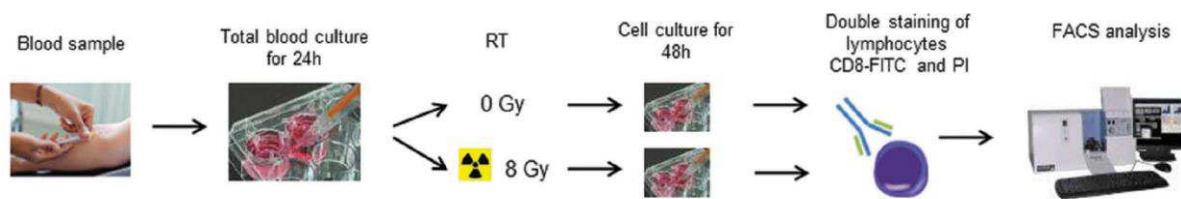


Figure 1: RILA assay procedure (from Brengues et al. (18))

After blood sample collection, blood is diluted in RPMI medium (1:10) and cultured at 37°C, 5% CO₂ for 24 h prior to ex-vivo irradiation (0 or 8 Gy). Irradiated whole blood is then cultured as before. After 48 h of culture, red blood cells are lysed and the remaining cells are labeled with FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibodies to select CD8 + T-lymphocytes that are then stained with propidium iodide (PI). Cells are analyzed by flow cytometry to determine the percentage of apoptotic cells.

Clinical data

The first prospective study using this RILA assay followed 399 patients with miscellaneous cancers treated with radiotherapy with curative intent (19). The CD4 and CD8 RILA assays were performed before radiotherapy, and patients were assessed for both acute and late toxicity. With a median follow-up of 30 months, T-lymphocyte radiation-induced apoptosis did not correlate with either early toxicity or survival. However, more radiation-induced T-lymphocyte apoptosis was significantly associated with less grade 2 and 3 late toxicity ($p < 0.0001$). CD8-

RILA was more sensitive and specific than CD4-RILA, and thus from this point on, most studies used CD8 T-lymphocytes apoptosis for the RILA assay.

This was confirmed in a phase II multicenter prospective study: the CO-HO-RT trial (20). 150 breast cancer patients were tested with the RILA assay before breast adjuvant radiotherapy. With a median follow-up of 26 months, high RILA scores (ie: high level of CD8-T-lymphocyte apoptosis after 8 Gy irradiation) proved once again to be associated with fewer grade 2 or more toxicities. Longer follow-up of these patients, as well as another prospective multicenter study on 502 breast cancer patients, confirmed these results (21,22). In both studies, a RILA score over 12% was significantly associated with lower grade 2 or more late breast fibrosis ($p=0.012$). However, in these studies, late fibrosis was also correlated with hormonotherapy and, although both hormonotherapy and RILA independently influenced late breast fibrosis, RILA appeared to be a continuous risk-variable rather than a high or low risk discrete variable (23). A recent review of the significance of the RILA in breast cancer summarizes these results (24).

RILA has also been assessed in 2 small prospective studies in cervical and head and neck cancer (25,26). In both cases a high RILA score was associated with lower severe late toxicities.

Larger studies have been published on prostate cancer, using both CD4 and CD8 T-lymphocytes (27–29). In all three studies, a higher RILA score was significantly associated with a lower-risk late toxicity. However, with rather small patient samples (45, 12 and 50 patients, respectively), the results were inconsistent between studies, one showing significantly lower genito-urinary toxicity, where the other only showed lower gastro-intestinal toxicities (27,29). However, in a more recent prospective multicenter trial on a larger population (383 patients), a RILA score over 15% was associated with lower grade 2 or more toxicities, both genito-urinary and gastro-intestinal, confirming both earlier studies' results (30).

Other cancer types, such as lung cancer, are currently being tested as part of a wide multicenter trial: the REQUITE project (31). This study, including breast and prostate cancer patients, should also further validate the data already published on these cancer types.

A summary of published studies and results by cancer types can be found in **Table 1**.

Tumor type	Data type	Patient number	Results	References
Breast	Prospective multicenter	577	Correlation with fibrosis (RILA cutoff = 12%)	(21–23)
Prostate	Prospective multicenter	692	Correlation with GU and GI toxicity (RILA cutoff = 15%)	(27–30)
Cervix	Prospective	94	Correlation with sexual toxicity	(25)
Head and neck	Prospective	79	Correlation with xerostomia	(26)
<i>Lung</i>	<i>Prospective multicenter</i>	<i>561</i>	<i>Data pending</i>	(31)

Table 1: Available data on RILA assay by tumor type

GU: genito-urinary, GI: gastro-intestinal

All of these data suggest that a high RILA score is associated with a low risk of late toxicity after radiotherapy. Subsequently, low-RILA patients should be considered at higher risk of developing severe late toxicity after radiotherapy, and alternate treatment should be considered when available (4). However, since no strong correlation has been found between low RILA and an increased risk of radiation-induced toxicities, radiotherapy should be maintained when it is the standard of care.

Although the mechanism of this inverse association is not completely clear, it may possibly be related to the delay of cells in recognizing the radiation-induced cell damage and initiating apoptosis, with a consequently increased risk of toxicity and, theoretically, of cancer radioresistance and reduced tumor control for low-RILA patients. However, to date, no correlation between low RILA values and low tumor control has been described in the literature.

The RILA assay has been used in numerous studies, in various centers and countries. Where earlier radiosensitivity assays had low reproducibility, this test is robust, and its results have been confirmed in different centers with similar results for same patients, further validating its use in different centers (32).

Although prospective data to predict toxicities were similar between all studies, one retrospective study found rather contradicting results in prostate cancer (33). This was a retrospective analysis of the Epinal radiation incident, where 409 prostate cancer patients received over 108% of the prescribed dose due to overexposure related to portal imaging. In this analysis, RILA did not correlate with inter-individual variations in maximum digestive or urinary toxicity. However, in this case, the magnitude of the overdosage may override the biological predictors of toxicity, including individual radiosensitivity.

More interestingly, a prospective study investigating 120 patients who developed radiation-induced sarcomas (RIS) found that patients with a high RILA value were less likely to develop RIS. In this matched cohort study, the mean RILA value was lower in RIS than in control patients (18.5% vs 22.3%, $p=0.0008$), and patients with a RILA > 21.3% were less likely to develop RIS ($p<0.0001$) (34).

RILA compared to other radiosensitivity assays

As discussed above, RILA tests have been performed on different cell populations. Where the first CD4 results were less reproducible than CD8 results, a recent study on 272 breast cancer patients with over 10 years of follow-up showed that low CD4-RILA was associated with increased risk for both fibrosis and telangiectasia (35). However, in this study, neither CD8 nor NK-RILA were correlated with late toxicity. Another comparison between CD4, CD8 and NK-RILA in breast cancer patients showed that both CD8 and NK lymphocytes were associated with late toxicity (36). A last study compared CD8 RILA to CD4 and B-lymphocyte RILA in 94 cervical cancer patients (37). In this study, both CD8 and B-lymphocyte RILA were significantly correlated with toxicities, whereas CD4-RILA was not.

Overall, RILA seems to be applicable to different lymphocyte populations. However, as the largest studies were published using CD8-T-lymphocytes, the standard cell population for this assay remains CD8 lymphocytes.

As seen before, RILA seems a robust and reproducible test to assess the risk of late radiation-induced toxicities and delayed complications in various cancer types. However, it seems important to compare it with other available radiosensitivity assays. As the only assay tested in a prospective multicenter study, RILA qualifies as the highest level of evidence. Only the SNP analysis in prostate cancer can also be considered level I, since a large meta-analysis has confirmed the link between their expression and radiosensitivity (38).

A summary of the different assays and their level of evidence is shown in **Table 2**.

Assay	Tissue Sample	Level of evidence	References
rs17599026 and rs7720298 SNPs for prostate cancer	Blood sample	I (meta-analysis)	(38)
RILA	Blood sample	I (prospective multicenter analysis)	(19,21,25,26,28,29,36,39,40)
SNPs for breast cancer	Blood sample	II (observational studies)	(41)
SNPs for lung cancer	Blood sample	II (observational studies)	(42,43)
Fibroblast-based assays	Skin biopsy	IV (retrospective studies)	(7,9,44)
G0 micronuclei	Blood sample	IV (retrospective studies)	(45,46)
G2 metaphase	Blood sample	IV (retrospective studies)	(45,47)
Residual γ -H2AX foci	Blood sample	IV (no validation studies)	(29,39,48)

Table 2: Available radiosensitivity assays with their respective level of evidence

SNP: single nucleotide polymorphism, RILA: Radiation-Induced Lymphocyte Apoptosis

In breast cancer patients, RILA was compared to other lymphocyte-based assays: residual DNA double-strand breaks (DSB), G0 and G2 micronucleus assay (39). In this case-control study, the

RILA assay performed best to detect individual radiosensitivity, with a strong correlation between the RILA value and the clinical outcome ($p < .01$), followed by the residual DSB and both micronuclei assays. The same results were shown in prostate cancer patients. When comparing RILA to γ -H2AX and G2 micronuclei assays, lymphocyte apoptosis analysis appeared to be the most suitable test for patients' radiosensitivity prediction (29).

In breast and head and neck cancer patients, CD3-lymphocyte radiation-induced apoptosis was compared to DNA strand breaks (Comet assay), γ -H2AX foci, and whole genome expression analyses (48). Once again, inter-individual variations and inter-laboratories variation were very high for most of these tests, although lymphocyte apoptosis seemed the most robust assay.

Initial DNA damage, measured by DSB, was also compared to RILA data in 26 breast cancer patients (49). In this study, patients who presented lower levels of initial DNA damage had higher RILA scores and fewer late toxicities. The two assays' results seemed correlated, although the patient sample was small and a prospective analysis is still required to confirm those results.

The only other radiosensitivity assay with a high level of evidence is the SNPs analysis for prostate cancer (38). In 2008, Azria et al. compared RILA results and these known SNPs variability in late radiation-induced toxicity prediction in 399 patients with miscellaneous cancers (50). In the low-RILA ($< 9\%$) patient group, where patients had higher toxicity rates, 94% of patients had 4 or more SNPs, whereas in the high-RILA group, only 33% had 4 or more SNPs. Although the numbers are rather small in this study, this points towards a good correlation between the two most robust assays for assessing individual radiosensitivity.

Overall, with a higher level of clinical evidence than most tests, the RILA assay appears to be one of the most robust tests and its results correlate to other available radiosensitivity assays.

Conclusion

Identifying patients at risk of severe radiation-induced toxicity before treatment is one of the cornerstones of precision medicine applied to radiotherapy. Although numerous assays have been developed over the last few decades, only a couple reach the highest level of evidence:

SNPs analysis in prostate cancer and the RILA assay in several cancer types. Out of these, the RILA assay seems the easiest to use in clinical routine. The procedure itself is rather simple and results can be obtained under a week's time. To date, it has been validated in breast, prostate, cervix, head and neck cancer, and validation in lung cancer is pending.

Although the mechanistic basis of this test still remains unclear, the RILA assay appears to be a robust help in deciding the best treatment course in radiotherapy planning. Taking into account tumor prognosis as well as late results and quality of life, the RILA assay, incorporated in a nomogram with the other independent factors, can be used safely in clinical setting. Wider use of this test would allow for a personalized risk-adapted approach to provide more effective treatments for patients receiving radiotherapy.

1. Taylor AM, Harnden DG, Arlett CF, Harcourt SA, Lehmann AR, Stevens S, et al. Ataxia telangiectasia: a human mutation with abnormal radiation sensitivity. *Nature*. 4 déc 1975;258(5534):427-9.
2. Bentzen SM, Overgaard M. Relationship between early and late normal-tissue injury after postmastectomy radiotherapy. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol*. mars 1991;20(3):159-65.
3. Turesson I, Nyman J, Holmberg E, Odén A. Prognostic factors for acute and late skin reactions in radiotherapy patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1 déc 1996;36(5):1065-75.
4. Azria D, Lapierre A, Gourgou S, De Ruyscher D, Colinge J, Lambin P, et al. Data-Based Radiation Oncology: Design of Clinical Trials in the Toxicity Biomarkers Era. *Front Oncol [Internet]*. 27 avr 2017;7. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5406456/>
5. Eschrich SA, Pramana J, Zhang H, Zhao H, Boulware D, Lee J-H, et al. A Gene Expression Model of Intrinsic Tumor Radiosensitivity: Prediction of Response and Prognosis After Chemoradiation. *Int J Radiat Oncol*. 1 oct 2009;75(2):489-96.
6. Hall WA, Bergom C, Thompson RF, Baschnagel AM, Vijayakumar S, Willers H, et al. Precision Oncology and Genomically Guided Radiation Therapy: A Report From the American Society for Radiation Oncology/American Association of Physicists in Medicine/National Cancer Institute Precision Medicine Conference. *Int J Radiat Oncol*. 1 juin 2018;101(2):274-84.
7. Burnet NG, Wurm R, Yarnold JR, Peacock JH, Nyman J, Turesson I. Prediction of normal-tissue tolerance to radiotherapy from *in-vitro* cellular radiation sensitivity. *The Lancet*. 27 juin 1992;339(8809):1570-1.
8. Russell NS, Grummels A, Hart AA, Smolders IJ, Borger J, Bartelink H, et al. Low predictive value of intrinsic fibroblast radiosensitivity for fibrosis development following radiotherapy for breast cancer. *Int J Radiat Biol*. juin 1998;73(6):661-70.
9. Oppitz U, Denzinger S, Nachtrab U, Flentje M, Stopper H. Radiation-induced comet-formation in human skin fibroblasts from radiotherapy patients with different normal tissue reactions. *Strahlenther Onkol Organ Dtsch Rontgengesellschaft Al*. juill 1999;175(7):341-6.
10. Kaspler P, Chen R, Hyrien O, Jelveh S, Bristow RG, Hill RP. Biodosimetry using radiation-induced micronuclei in skin fibroblasts. *Int J Radiat Biol*. 1 août 2011;87(8):824-38.

11. Bentzen SM. Randomized controlled trials in health technology assessment: overkill or overdue? *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol.* févr 2008;86(2):142-7.
12. Elyan SA, West CM, Roberts SA, Hunter RD. Use of an internal standard in comparative measurements of the intrinsic radiosensitivities of human T-lymphocytes. *Int J Radiat Biol.* oct 1993;64(4):385-91.
13. West CML, Elyan SAG, Berry P, Cowan R, Scott D. A Comparison of the Radiosensitivity of Lymphocytes from Normal Donors, Cancer Patients, Individuals with Ataxia-telangiectasia (A-T) and A-T Heterozygotes. *Int J Radiat Biol.* 1 janv 1995;68(2):197-203.
14. Huber R, Braselmann H, Bauchinger M. Intra- and Inter-individual Variation of Background and Radiation-induced Micronucleus Frequencies in Human Lymphocytes. *Int J Radiat Biol.* 1 janv 1992;61(5):655-61.
15. Twardella D, Popanda O, Helmbold I, Ebbeler R, Benner A, von Fournier D, et al. Personal characteristics, therapy modalities and individual DNA repair capacity as predictive factors of acute skin toxicity in an unselected cohort of breast cancer patients receiving radiotherapy. *Radiother Oncol.* 1 nov 2003;69(2):145-53.
16. Crompton NEA, Shi Y-Q, Emery GC, Wisser L, Blattmann H, Maier A, et al. Sources of variation in patient response to radiation treatment. *Int J Radiat Oncol.* 1 févr 2001;49(2):547-54.
17. Ozsahin M, Ozsahin H, Shi Y, Larsson B, Würgler FE, Crompton NE. Rapid assay of intrinsic radiosensitivity based on apoptosis in human CD4 and CD8 T-lymphocytes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1 mai 1997;38(2):429-40.
18. Brengues M, Lapierre A, Bourcier C, Pèlegriin A, Özsahin M, Azria D. T lymphocytes to predict radiation-induced late effects in normal tissues. *Expert Rev Mol Diagn.* 22 déc 2016;1-9.
19. Ozsahin M, Crompton NEA, Gourgou S, Kramar A, Li L, Shi Y, et al. CD4 and CD8 T-lymphocyte apoptosis can predict radiation-induced late toxicity: a prospective study in 399 patients. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 oct 2005;11(20):7426-33.
20. Azria D, Belkacemi Y, Romieu G, Gourgou S, Gutowski M, Zaman K, et al. Concurrent or sequential adjuvant letrozole and radiotherapy after conservative surgery for early-stage breast cancer (CO-HO-RT): a phase 2 randomised trial. *Lancet Oncol.* 1 mars 2010;11(3):258-65.

21. Azria D, Riou O, Castan F, Nguyen TD, Peignaux K, Lemanski C, et al. Radiation-induced CD8 T-lymphocyte Apoptosis as a Predictor of Breast Fibrosis After Radiotherapy: Results of the Prospective Multicenter French Trial. *EBioMedicine*. déc 2015;2(12):1965-73.
22. Bourcier C, Kerns S, Gourgou S, Lemanski C, Gutowski M, Fenoglietto P, et al. Concurrent or sequential letrozole with adjuvant breast radiotherapy: final results of the CO-HO-RT phase II randomized trial. *Ann Oncol*. mars 2016;27(3):474-80.
23. Bourcier C, Castan F, Riou O, Nguyen T-D, Peignaux K, Lemanski C, et al. Impact of adjuvant hormonotherapy on radiation-induced breast fibrosis according to the individual radiosensitivity: results of a multicenter prospective French trial. *Oncotarget*. 20 mars 2018;9(21):15757-65.
24. Fhoghlú MN, Barrett S. A Review of Radiation-Induced Lymphocyte Apoptosis as a Predictor of Late Toxicity After Breast Radiotherapy. *J Med Imaging Radiat Sci*. juin 2019;50(2):337-44.
25. Bordón E, Henríquez Hernández LA, Lara PC, Pinar B, Fontes F, Rodríguez Gallego C, et al. Prediction of clinical toxicity in localized cervical carcinoma by radio-induced apoptosis study in peripheral blood lymphocytes (PBLs). *Radiat Oncol Lond Engl*. 26 nov 2009;4:58.
26. Bordón E, Henríquez-Hernández LA, Lara PC, Ruíz A, Pinar B, Rodríguez-Gallego C, et al. Prediction of clinical toxicity in locally advanced head and neck cancer patients by radio-induced apoptosis in peripheral blood lymphocytes (PBLs). *Radiat Oncol Lond Engl*. 28 janv 2010;5:4.
27. Schnarr K, Boreham D, Sathya J, Julian J, Dayes IS. Radiation-Induced Lymphocyte Apoptosis to Predict Radiation Therapy Late Toxicity in Prostate Cancer Patients. *Int J Radiat Oncol*. 1 août 2009;74(5):1424-30.
28. Foro P, Algara M, Lozano J, Rodriguez N, Sanz X, Torres E, et al. Relationship Between Radiation-Induced Apoptosis of T Lymphocytes and Chronic Toxicity in Patients With Prostate Cancer Treated by Radiation Therapy: A Prospective Study. *Int J Radiat Oncol*. 1 avr 2014;88(5):1057-63.
29. Pinkawa M, Brzozowska K, Kriehuber R, Eble MJ, Schmitz S. Prediction of radiation-induced toxicity by *in vitro* radiosensitivity of lymphocytes in prostate cancer patients. *Future Oncol*. 25 janv 2016;12(5):617-24.
30. Azria D, Créhange G, Castan F, Belkacemi Y, Lagrange J, Nguyen T, et al. Le taux d'apoptose lymphocytaire radio-induit CD8 prédicteur de la toxicité pelvienne après radiothérapie prostatique : résultats de l'étude prospective multicentrique française. *Prog En Urol*. 1 nov 2019;29(13):745.

31. Seibold P, Webb A, Aguado-Barrera ME, Azria D, Bourgier C, Brengues M, et al. REQUITE: A prospective multicentre cohort study of patients undergoing radiotherapy for breast, lung or prostate cancer. *Radiother Oncol*. 1 sept 2019;138:59-67.
32. Talbot CJ, Veldwijk MR, Azria D, Batini C, Bierbaum M, Brengues M, et al. Multi-centre technical evaluation of the radiation-induced lymphocyte apoptosis assay as a predictive test for radiotherapy toxicity. *Clin Transl Radiat Oncol*. 10 juin 2019;18:1-8.
33. Vogin G, Merlin J-L, Rousseau A, Peiffert D, Harlé A, Husson M, et al. Absence of correlation between radiation-induced CD8 T-lymphocyte apoptosis and sequelae in patients with prostate cancer accidentally overexposed to radiation. *Oncotarget*. 24 août 2018;9(66):32680-9.
34. Mirjolet C, Merlin JL, Truc G, Noël G, Thariat J, Domont J, et al. RILA blood biomarker as a predictor of radiation-induced sarcoma in a matched cohort study. *EBioMedicine*. 1 mars 2019;41:420-6.
35. Veldwijk MR, Seibold P, Botma A, Helmbold I, Sperk E, Giordano FA, et al. Association of CD4+ Radiation-Induced Lymphocyte Apoptosis with Fibrosis and Telangiectasia after Radiotherapy in 272 Breast Cancer Patients with >10-Year Follow-up. *Clin Cancer Res*. 15 janv 2019;25(2):562-72.
36. Fuentes-Raspall MJ, Caragol I, Alonso C, Ramón y Cajal T, Fisas D, Seoane A, et al. Apoptosis for prediction of radiotherapy late toxicity: lymphocyte subset sensitivity and potential effect of TP53 Arg72Pro polymorphism. *Apoptosis*. 1 mars 2015;20(3):371-82.
37. Bordón E, Henríquez-Hernández LA, Lara PC, Pinar B, Rodríguez-Gallego C, Lloret M. Role of CD4 and CD8 T-lymphocytes, B-lymphocytes and Natural Killer cells in the prediction of radiation-induced late toxicity in cervical cancer patients. *Int J Radiat Biol*. avr 2011;87(4):424-31.
38. Andreassen CN, Rosenstein BS, Kerns SL, Ostrer H, De Ruysscher D, Cesaretti JA, et al. Individual patient data meta-analysis shows a significant association between the ATM rs1801516 SNP and toxicity after radiotherapy in 5456 breast and prostate cancer patients. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol*. 18 juill 2016;
39. Vandevoorde C, Depuydt J, Veldeman L, Neve WD, Sebastià N, Wieme G, et al. *In vitro* cellular radiosensitivity in relationship to late normal tissue reactions in breast cancer patients: a multi-endpoint case-control study. *Int J Radiat Biol*. 1 sept 2016;0(0):1-14.

40. Winkler S, Hoppe P, Haderlein M, Hecht M, Fietkau R, Distel LV. Ex Vivo Apoptosis in CD8+ Lymphocytes Predicts Rectal Cancer Patient Outcome [Internet]. Vol. 2016, Gastroenterology Research and Practice. Hindawi; 2016 [cité 29 mai 2020]. p. e5076542. Disponible sur: <https://www.hindawi.com/journals/grp/2016/5076542/>
41. Talbot CJ, Tanteles GA, Barnett GC, Burnet NG, Chang-Claude J, Coles CE, et al. A replicated association between polymorphisms near TNF α and risk for adverse reactions to radiotherapy. *Br J Cancer*. 7 août 2012;107(4):748-53.
42. Guerra JLL, Gomez D, Wei Q, Liu Z, Wang L-E, Yuan X, et al. Association between single nucleotide polymorphisms of the transforming growth factor β 1 gene and the risk of severe radiation esophagitis in patients with lung cancer. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol*. déc 2012;105(3):299-304.
43. Pang Q, Wei Q, Xu T, Yuan X, Lopez Guerra JL, Levy LB, et al. Functional promoter variant rs2868371 of HSPB1 is associated with risk of radiation pneumonitis after chemoradiation for non-small cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1 avr 2013;85(5):1332-9.
44. Geara FB, Peters LJ, Kian Ang K, Wike JL, Brock WA. Prospective comparison of *in vitro* normal cell radiosensitivity and normal tissue reactions in radiotherapy patients. *Int J Radiat Oncol*. 1 déc 1993;27(5):1173-9.
45. SCOTT D. Increased chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: a comparison of two assays. *Int J Radiat Biol*. 1 janv 1999;75(1):1-10.
46. Padjas A, Kedzierawski P, Florek A, Kukolowicz P, Kuszewski T, Góźdz S, et al. Comparative analysis of three functional predictive assays in lymphocytes of patients with breast and gynaecological cancer treated by radiotherapy. *J Contemp Brachytherapy*. déc 2012;4(4):219-26.
47. Fannon P, Kabacik S, MacKay A, Raffy C, A'Hern R, Owen R, et al. Correlation of *in vitro* lymphocyte radiosensitivity and gene expression with late normal tissue reactions following curative radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol*. déc 2012;105(3):329-36.
48. Greve B, Bölling T, Amler S, Rössler U, Gomolka M, Mayer C, et al. Evaluation of different biomarkers to predict individual radiosensitivity in an inter-laboratory comparison--lessons for future studies. *PloS One*. 2012;7(10):e47185.

49. Pinar B, Henríquez-Hernández LA, Lara PC, Bordon E, Rodriguez-Gallego C, Lloret M, et al. Radiation induced apoptosis and initial DNA damage are inversely related in locally advanced breast cancer patients. *Radiat Oncol Lond Engl*. 24 sept 2010;5:85.
50. Azria D, Ozsahin M, Kramar A, Peters S, Atencio DP, Crompton NEA, et al. Single nucleotide polymorphisms, apoptosis, and the development of severe late adverse effects after radiotherapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 oct 2008;14(19):6284-8.

RILA – conclusion

Avec plus d'une dizaine d'études publiées à ce jour, et plusieurs essais multicentriques, le RILA semble actuellement le test le plus pertinent cliniquement pour identifier les patients à risque de développer des toxicités sévères après radiothérapie. Il est actuellement validé dans les cancers du sein, de la prostate, du col utérin, de la tête et du cou, et est en cours de validation dans les cancers du poumon.

Sa procédure est simple et les résultats sont disponibles en moins d'une semaine, ce qui facilite son usage en clinique.

Cependant, à ce jour, les mécanismes moléculaires permettant d'expliquer ce test restent inconnus. En effet, il n'y a pas de données permettant d'expliquer en quoi l'apoptose des lymphocytes après irradiation serait un reflet de la fibrose dans les tissus sains.

Partie 2 : PON1

PON1 : découverte et caractéristiques

La paraoxonase 1 (Human Serum Paraoxonase-1) (PON1) est une enzyme calcium-dépendante présente chez de nombreuses espèces. Elle a été identifiée dans les années 40 et caractérisée dans les années 50 (Aldridge, 1953; Mazur, 1946). Son nom vient de sa capacité à détoxifier le paraoxone, un composé organophosphoré, substance active du parathion, un insecticide utilisé dans l'agriculture.

Elle est également capable d'hydrolyser de nombreux composants tels que des organophosphorés (dont le paraoxone et le chlorpyrifos), des lactones (dont la spironolactone), des thiolactones, des arylesters, des carbonates cycliques, des gaz neurotoxiques (tels que le sarin), des glucuronides et des esters d'œstrogène (Mackness and Mackness, 2015).

Le séquençage du gène de PON1 a été réalisé en 1991 par Hassett et al (Hassett et al., 1991). Il est situé entre les loci q21.3 et q22.1 du chromosome 7 et mesure 1294 paires de bases. La protéine qui en est issue fait 354 acides aminés pour 43kDa et présente une homologie inter-espèce très importante (75-95%) (Primo-Parmo et al., 1996).

Son analyse en cristallographie a permis de mettre en évidence une structure en β -propeller (Figure 1), constituée de 6 feuillets β , composée chacun de 4 brins (Harel et al., 2004). Deux ions Calcium sont situés dans le tunnel central, l'un ayant un rôle structurel, l'autre un rôle catalytique.

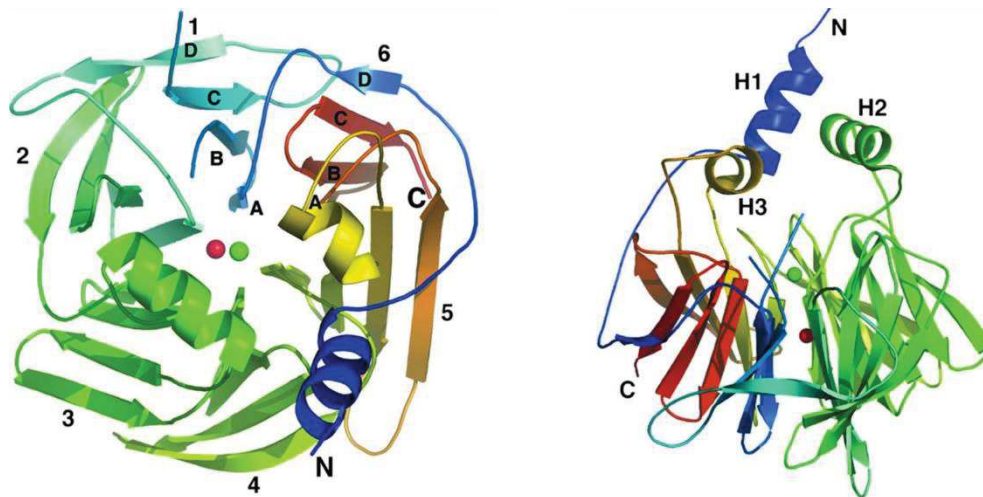


Figure 1 : Structure tridimensionnelle de PON1. D'après de Harel et al. (Harel et al., 2004)

Chez l'homme, PON1 est synthétisée par le foie et les reins, et dans une moindre mesure, le colon (Mackness et al., 2010). Elle est sécrétée dans le sang, où on la retrouve exclusivement liée aux HDL (High-Density Lipoprotein) (Mackness, 1989). Elle fait de ce fait partie d'un ensemble d'enzymes associées aux HDL tels que la lecithin-cholesterol acyltransferase et la platelet-activating factor acetylhydrolase, et responsables de l'activité antioxydante des HDL (Shunmoogam et al., 2018).

Activités enzymatiques de PON1

Bien que l'analyse de la structure moléculaire de PON1 semble suggérer que son substrat principal soit les lactones, PON1 a la capacité d'hydrolyser de nombreux types de molécules (Khersonsky and Tawfik, 2005). Historiquement, la première activité enzymatique à avoir été mesurée est l'activité organophosphatase. Le paraoxone est un substrat très spécifique de l'activité plasmatique de PON1 car PON1 est la seule enzyme connue capable de détoxifier cette molécule (Shih et al., 1998). L'analyse de l'hydrolyse du paraoxone par PON1 permet donc d'évaluer son activité enzymatique. Cependant, cette procédure a deux inconvénients majeurs : d'une part, le paraoxone est extrêmement toxique et sa manipulation est donc délicate. D'autre part, la constante catalytique liée au paraoxone est faible, et la mesure de cette activité est donc très longue (Khersonsky and Tawfik, 2005). Une méthode plus rapide et plus simple de détection de l'activité organophosphatase est d'utiliser le DEPFMU (7-diethylphospho-6,8-difluor-4-methylumbelliferyl). Ce substrat permet une analyse très sensible et spécifique de l'activité de PON1 en utilisant la fluorescence (Soukharev and Hammond, 2004).

L'activité de PON1 la plus mesurée en routine est son activité arylestérase. Cette analyse est rapide et utilise un substrat simple et peu toxique : le phénylacétate (Soukharev and Hammond, 2004). Cette activité est toutefois moins spécifique car le phénylacétate peut être hydrolysé par de nombreuses autres enzymes présentes dans le sérum ou en intracellulaire.

L'activité lactonase est plus délicate à mesurer, mais cela peut être réalisé en utilisant des 5-Thioalkyl butyrolactones (Khersonsky and Tawfik, 2006). Elle est cependant très intéressante à étudier car elle est la seule activité partagée entre les différents membres de la famille PON (Draganov et al., 2005).

Bien que les différentes activités de PON1 aient été étudiées en détail, la fonction enzymatique impliquée dans la prévention de l'oxydation des LDL est encore mal connue. En effet, il semblerait qu'il ne s'agisse pas de l'activité arylestérase, ni de l'activité organophosphatase (Cao et al., 1999). Il est possible que l'activité impliquée dans ce phénomène soit l'activité lactonase : en effet, c'est la seule activité enzymatique affectée par la présence de l'apolipoprotéine apoA-1 (Khersonsky and Tawfik, 2006).

L'expression et l'activité de PON1 peuvent être modulées par de nombreux facteurs. De façon intéressante, les statines et les fibrates, deux classes de molécules utilisées dans la dyslipidémie, augmentent l'expression et l'activité de PON1 *in vitro* (Costa et al., 2011). En particulier, la simvastatine semble exercer un contrôle positif dose-dépendant sur l'activité du promoteur de PON1 *in vitro* (Deakin et al., 2003). En clinique, cela se traduit par une augmentation de l'activité plasmatique de PON1 chez les patients traités par simvastatine ou atorvastatine (Costa et al., 2011). De même, l'aspirine à faible dose, telle qu'utilisée dans les pathologies cardiovasculaires, permet une augmentation de l'expression de l'apoA-1 et de PON1 *in vitro* (Jaichander et al., 2008). En revanche, le clopidogrel, un autre anti-agrégant plaquettaire, ne semble pas affecter PON1 (Tresukosol et al., 2014).

D'autres drogues comme les anti-diabétiques oraux (tel que le rosiglitazone) entraînent une augmentation de l'activité de PON1 chez l'homme (van Wijk et al., 2006). Le cyclophosphamide, un anti-cancéreux, certains œstrogènes de synthèse, ou encore l'érythropoïétine bêta ont été montrés comme induisant une augmentation de l'activité plasmatique de PON1 dans diverses études (Abraham and Sugumar, 2008; Kiranoglu et al., 2007; Marsillach et al., 2007).

PON1 peut également être activé par des anti-oxydants alimentaires, tels que la vitamine C ou les polyphénols (Costa et al., 2011). A l'inverse, une augmentation du stress oxydant, par la consommation régulière d'alcool ou de tabac est corrélée à une diminution de l'activité plasmatique de PON1 (Précourt et al., 2011).

Données animales sur le rôle de PON1

Afin d'étudier le rôle de PON1 *in vivo*, en 1998, Shih et al ont développé un modèle de souris PON1 KO (Shih et al., 1998). Chez ces souris, il a été montré que les HDL ne pouvaient prévenir ni l'oxydation des LDL ni la chimiotaxie des monocytes. Ces souris étaient également beaucoup plus sensibles aux composants organophosphorés tels que le chlopyrifos. Même *ex vivo*, des HDL obtenues à partir de souris PON1 (-/-) ne permettaient pas de prévenir l'oxydation de LDL, par rapport aux HDL de souris contrôles.

Des souris KO pour PON1 et l'apolipoprotéine E (apoE) présentaient également plus de lésions athéromateuses que les souris contrôles, après un régime riche en graisses (Shih et al., 2000).

Par contre, de façon intéressante, les souris PON1 KO présentent une activité paraoxonase *in vitro* réduite de seulement 50% et une activité arylestérase de 15%, démontrant que ces activités enzymatiques ne sont pas l'apanage de PON1 *in vivo*.

A l'inverse, un modèle de souris transgénique surexprimant PON1 présentait moins de lésions athéromateuses que les souris contrôles, et les HDL isolés à partir de ces souris inhibaient de façon efficace la peroxydation des lipides *in vitro* (Oda et al., 2002; Tward Aaron et al., 2002).

PON2 et PON3

La famille des paraoxonases comprend 3 gènes, PON1, PON2, and PON3, tous situés à la suite sur le chromosome 7 (Furlong et al., 2016). Les trois protéines PON sont impliquées dans la régulation du stress oxydant et de l'inflammation. Bien que seule PON1 ait la capacité à hydrolyser le paraoxone, les deux autres enzymes ont été dénommées de façon identique du fait de leur grande ressemblance.

PON2 est une enzyme de 43kDa ubiquitaire et intracellulaire. Contrairement à PON1 et PON3, elle n'est pas retrouvée dans le plasma (Ng et al., 2001). Son expression est par contre beaucoup plus large puisque cette protéine est retrouvée dans le foie, les poumons, les reins, le cœur, le pancréas, l'intestin grêle, les muscles, le cerveau, les tissus testiculaires, les cellules endothéliales et épithéliales et les macrophages (Levy et al., 2007; Mackness et al., 2010). Au niveau intracellulaire, PON2 est surtout présente dans la mitochondrie et le réticulum endoplasmique.

A l'instar de PON1, PON2 est une lactonase, et elle est impliquée dans la réduction du stress oxydant dans de nombreux tissus (Draganov et al., 2005). PON2 semble avoir un rôle prépondérant dans la prévention de l'athérosclérose. En effet, des souris PON2 $-/-$ développent des lésions diffuses d'athérome, par rapport aux contrôles (Ng et al., 2006). Dans les macrophages, PON2 semble empêcher l'accumulation de triglycérides, et ainsi, diminuer le stress oxydant (Rosenblat et al., 2009). Au niveau intracellulaire, la PON2 présente au niveau mitochondrial prévient la formation d'ions superoxydes et ainsi, l'apoptose (Altenhöfer et al., 2010).

PON3 est une protéine de 40kDa dont la synthèse, est, comme pour PON1, principalement réalisée dans le foie et les reins. PON3 est également présent dans le plasma, lié aux HDL (Draganov et al., 2000). Cependant, comme PON2, elle est également présente en intracellulaire, au niveau de la mitochondrie (Schweikert et al., 2012).

Tout comme PON1 et PON2, PON3 est une lactonase. Comme PON1, son activité est Calcium dépendante, mais son activité catalytique sur les statines semble plus élevée que celle de PON1 (Draganov et al., 2005). PON3 est la moins bien caractérisée des trois PON. De ce fait, son rôle physiologique est mal connu, même si, *in vitro*, elle prévient, au même titre que PON1, l'oxydation des

LDL, bien que sa concentration dans le plasma soit inférieure de moitié à celle de PON1 (Draganov et al., 2000).

Polymorphisme de PON1

Les premières études sur PON1 dans les années 60 et 70 ont mis en évidence une très grande variabilité individuelle du niveau d'activité de cette protéine dans le plasma (Mallinckrodt and Diepgen, 1988). Ceci est dû à la présence d'un important polymorphisme génétique de PON1. Bien que 5 variations du gènes soient décrites seules 2 ont un impact sur l'expression et l'activité de la protéine (Januszek, 2016). La plus fréquente est celle responsable de la substitution d'un acide aminé Q192R (vient ensuite M55L). Ce polymorphisme est à l'origine d'un allèle dit de « faible activité » (codant pour une glutamine ou 192Q) et un allèle de « forte activité » (codant pour une arginine ou 192R). Le polymorphisme Q192R est détectable de façon simple par PCR, sans avoir recours au séquençage. En effet, la mutation responsable de ce polymorphisme fait apparaître un site de restriction pour l'enzyme *Alw1*, permettant l'identification rapide chez les patients (Humbert et al., 1993).

Etant donné l'impact du polymorphisme de PON1 sur son activité enzymatique, il est également possible de déterminer le génotype en analysant l'hydrolyse de 2 substrats : le diazoxone et le paraoxone (Richter and Furlong, 1999). La comparaison de ces 2 activités permet d'identifier le génotype sans avoir recours à une analyse génétique, mais elle fait appel à des substrats extrêmement toxiques (organophosphorés). Des études plus récentes ont permis de montrer qu'il était possible de réaliser cette analyse d'activité en utilisant des substrats moins toxiques : le phénylacétate et le 4-(Chlorométhyl)phényl acétate (CMPA) (Richter et al., 2008, 2009).

Les populations européennes comptent environ 50% d'individus homozygotes pour la forme de faible activité, alors que les populations d'Asie ou d'Afrique ont une plus forte fréquence d'individus homozygotes pour la forme très active de l'enzyme (Brophy et al., 2002). Les activités paraoxonase et arylestérase de la protéine peuvent varier d'un facteur 40 entre l'isoforme Q et l'isoforme R (Mackness et al., 1998a). Le polymorphisme L55M modifie l'affinité de PON1 pour les HDL, l'isoforme 55LL ayant une affinité plus élevée (Leviev et al., 2001). Les isoformes 192QQ et 55MM offrent donc une meilleure protection contre l'oxydation des LDL *in vitro* (Mackness et al., 1998b). Cependant, cette variabilité génétique semble ne pas modifier la capacité à inhiber la peroxydation des LDL par PON1 (Cao et al., 1999). Cette propriété est donc le fruit d'une autre activité enzymatique de PON1, bien que celle-ci ne soit pas encore clairement identifiée.

L'impact clinique du polymorphisme de PON1 est difficile à déterminer. Le polymorphisme seul ne semble pas exposer à un surrisque franc de maladie cardiovasculaire. En effet, dans une population de patients victimes d'infarctus du myocarde, la proportion de génotype 192QQ et 192RR est similaire à celle de la population contrôle (Serrato and Marian, 1995). De même, une méta-analyse de 88 études cas-témoin semble montrer une association entre le génotype 192RR et la cardiopathie ischémique, mais cette association n'est pas significative (Wang et al., 2011). Cependant, l'association de l'isoforme 192QQ et d'un faible niveau de HDL circulant semble exposer à un surrisque d'infarctus myocardique par rapport aux patients présentant un taux d'HDL normal, et ce, de façon plus importante que l'isoforme 192RR (Sentí Mariano et al., 2001).

Concernant le risque de cancer, une étude de Stevens et al montre que le polymorphisme génétique de PON1 pouvait exposer à un risque de cancer agressif de prostate plus important, bien que cela ne soit pas significatif (Stevens et al., 2008). Une méta-analyse portant du 43 études confirme cette tendance, avec un surrisque de cancer (tous types confondus) avec l'isoforme 55M par rapport à l'isoforme 55L, et un surrisque de cancer du sein avec l'isoforme 192Q (Pan et al., 2019).

PON1 et clinique

PON1 est associé aux HDL dans la circulation, et peut prévenir la peroxydation des lipides. Il est donc licite de penser qu'il pourrait avoir un rôle protecteur contre l'athérome chez l'homme, comme dans les modèles murins.

Les HDL ont des propriétés anti-inflammatoires via la protection de l'oxydation des LDL. En effet, les LDL oxydés engendrent une modification endothéliale des vaisseaux, avec des modifications pro-athéromateuses avec une infiltration par des lymphocytes et des macrophages spumeux, responsables d'une inflammation locale (Chistiakov et al., 2017). L'effet anti-inflammatoire des HDL est médié par un équilibre entre l'activité de PON1 et de la myéloperoxydase (MPO) (Haraguchi et al., 2014). Dans la maladie athéromateuse, une hyperactivation de la MPO peut entraîner une dysfonction des HDL et une majoration de l'oxydation des LDL.

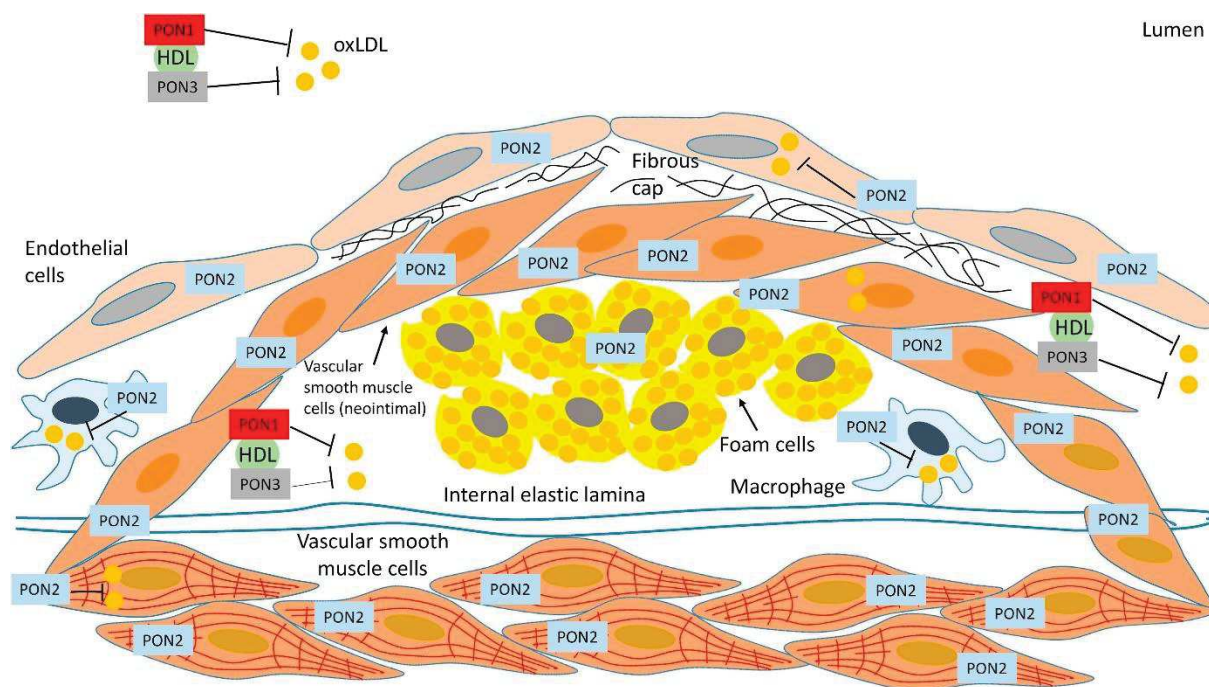


Figure 2 : Action des paraoxonases dans l'athérome. Reproduit à partir de Chistiakov et al. (Chistiakov et al., 2017)

Différentes études ont montré une diminution significative de l'activité de PON1 chez des patients atteints de coronaropathie ou d'infarctus du myocarde (Ayub Aamir et al., 1999; Durmaz et al., 2014; Shen et al., 2015). En revanche, le polymorphisme de PON1 n'est pas responsable directement d'un effet athéroprotecteur à l'échelle de l'individu, et les individus porteurs de l'isoforme de faible activité 192QQ ne présentent pas de surrisque cardiovasculaire par rapport aux autres (Fridman et al., 2016; Wang et al., 2011). Cependant, une diminution de l'activité arylestérase de PON1 dans le sérum (activité non affectée par le polymorphisme Q192R) expose à un risque plus élevé de maladie cardiovasculaire dans les études (Tang W.H. Wilson et al., 2012).

Au-delà de son rôle dans la maladie athéromateuse, une diminution de l'activité plasmatique de PON1 peut être observée dans les rhumatismes inflammatoires et la cirrhose hépatique (Baskol et al., 2005; Ferré et al., 2002; Sabesin et al., 1977).

Plusieurs études ont suggéré une association entre le polymorphisme L55M de PON1 et l'incidence de la maladie de Parkinson, sans que les bases physiologiques de cette association soient clairement établies (Mota et al., 2019). De même, le polymorphisme Q192R pourrait être à l'origine d'un surrisque de dépression chez les patients exprimant l'isoforme RR (Lawlor et al., 2007).

PON1 et cancer

Au-delà des maladies métaboliques, de nombreuses études ont fait état d'un lien entre l'activité de PON1 et le cancer. Une méta-analyse publiée en 2018 montre en effet que 23 études rapportent une diminution de l'activité plasmatique de PON1 chez les patients atteints de cancers solides (Arenas et al., 2018). Etant donné le lien connu entre cancer et stress oxydant, il est possible que l'activité de PON1, protégeant du stress oxydant circulant, puisse être anti-cancéreuse, et que son inactivation augmente donc le risque d'instabilité génétique et de prolifération tumorale.

Dans les cancers de la cavité orale, par exemple, il a été montré que les activités paraoxonase et arylestérase de PON1 dans le plasma étaient significativement plus faibles par rapport aux patients contrôles (Malik et al., 2014). Mais au-delà de l'observation du niveau d'activité de PON1, il semblerait que cette activité puisse avoir un rôle pronostique. En effet, chez des patients présentant une récurrence de cancer du sein, l'activité arylestérase plasmatique de PON1 (mais pas son activité paraoxonase) était inversement corrélée à la survie des patients, montrant qu'une diminution de PON1 était, non seulement un marqueur de cancer, mais également un facteur pronostique dans l'évolution de celui-ci (Bobin-Dubigeon et al., 2012).

Le polymorphisme de PON1, ayant une influence directe sur le niveau d'activité plasmatique de la protéine, semble également augmenter le risque de cancer : dans la cohorte CPS-II, les patients porteurs des isoformes moins actives (192R et 55M) présentaient un risque plus élevé de cancer de prostate agressive (Stevens et al., 2008).

Une étude s'est intéressée à l'impact que pouvait avoir PON1 au niveau moléculaire et cellulaire dans le développement du cancer du poumon (Aldonza et al., 2017). De façon intéressante, dans ce modèle, la surexpression de PON1 dans les cellules tumorales augmentait le potentiel d'invasion métastatique des cellules tumorales *in vitro* et la croissance de xénogreffes *in vivo*. De même, la surexpression de PON1 protégeait les cellules tumorales contre de nombreuses drogues anticancéreuses, en limitant l'apoptose. Au niveau moléculaire, cette action passe par la détoxification des ROS au niveau de la mitochondrie. Au total, cette étude semble confirmer l'importance du rôle anti-oxydant de PON1 dans le développement des cancers et en particulier la réponse cellulaire aux stress pouvant engendrer de l'apoptose.

De façon similaire, PON2 est fréquemment surexprimée dans les cellules cancéreuses et, *in vitro*, cette surexpression semble protéger contre la mort radio-induite des cellules, par diminution du stress oxydant intracellulaire, et en particulier la résistance aux ROS (Krüger et al., 2015, 2016).

PON3 semble également surexprimée dans diverses tumeurs, et l'impact de cette surexpression au niveau moléculaire semble également passer par la diminution du stress oxydant au niveau mitochondrial et la réduction de l'apoptose induite par la voie intrinsèque (Schweikert et al., 2012).

Au total, la famille des paraoxonases, dont PON1, via leur potentiel anti-oxydant, semble impliquée dans le développement des cancers et la réponse des cellules tumorales aux traitements, y compris la radiothérapie.

Objectifs

L'objectif de cette thèse a été de rechercher un rationnel moléculaire et cellulaire aux résultats du RILA. En effet, bien que les mécanismes conduisant à la fibrose radio-induite soient bien connus et publiés (Wang et al., 2020), l'implication des lymphocytes périphériques, et en particulier des lymphocytes T CD8, dans ce phénomène est plus incertaine.

La première étape pour comprendre les résultats du RILA était donc de voir quels facteurs pouvaient influencer ses résultats. Des travaux préliminaires réalisés dans notre équipe ont mis en évidence que des facteurs sécrétés par les lymphocytes pouvaient influencer le résultat du RILA *in vitro*.

A partir de cette observation, nous nous sommes intéressés à ces facteurs sécrétés. Une des difficultés de l'étude mécanistique du RILA est que ce test est basé sur des échantillons de sang humain à l'état frais. La reproductibilité des expériences était donc difficile à obtenir à moins de faire revenir les patients à de multiples reprises, ce qui, sur le plan éthique, présentait de nombreuses limites. La première partie de ce travail a donc été de mettre au point un modèle cellulaire, basé sur des lignées cellulaires, permettant l'étude du RILA à plus grande échelle, et de façon plus reproductible. Une fois ce modèle développé, nous avons cherché à étudier l'impact des facteurs lymphocytaires identifiés sur les résultats du test, appliqué à ce modèle *in vitro*, par usage de drogues permettant la modulation de l'expression ou l'inhibition de ces facteurs, ou par modification génétique des modèles.

Cependant, les limites du modèle cellulaire ont rapidement été atteintes, du fait de leur mauvaise corrélation avec les résultats observés chez les lymphocytes sains. En se basant à nouveau sur les échantillons provenant de patients, nous avons donc validé à plus grande échelle les résultats initiaux, afin de confirmer la corrélation entre les facteurs sécrétés et le résultat du RILA.

Nous avons par la suite étudié différentes populations de patients, basées sur les résultats du RILA, afin d'observer si les facteurs mis en évidence initialement pouvaient être corrélés à d'autres voies de signalisations cellulaires, impliquées dans la réponse à l'irradiation. Ainsi, nous avons cherché à replacer les facteurs influençant le RILA dans les cascades de signalisations cellulaires activées en réponse à l'irradiation. Ce faisant, nous avons mis en évidence une corrélation d'expression entre deux facteurs nouvellement identifiés et nous avons donc exploré cette corrélation.

Enfin, afin de comprendre la sécrétion de ces facteurs, nous nous sommes intéressés aux caractéristiques cliniques des patients, afin de comprendre ce qui pouvait conditionner l'expression de ces facteurs, et donc les résultats du RILA.

L'identification de facteurs moléculaires pouvant modifier les résultats du RILA *in vitro* permettraient, si leur effet se traduit à l'échelle de l'individu d'influencer les résultats du test en clinique. Si cela se confirme, ces facteurs pourraient conduire à l'identification de méthodes de modulation de la radiosensibilité individuelle à l'échelle des patients, afin d'améliorer les résultats à long terme de la radiothérapie.

Matériel et méthodes

Lignées cellulaires

La lignée Jurkat a été fournie par un laboratoire de Toulouse et a été authentifiée par Eurofins. La lignée HPB-ALL a été achetée au DMSZ German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH (DMSZ n° ACC 483). Ces deux lignées ont été cultivées en milieu RPMI Medium 1640 - GlutaMAX™ (Thermofisher 61870-010) 10% sérum plus pénicilline-streptomycine.

La lignée HEK 293-T a été fournie par le laboratoire du Dr Pascal Schneider, UNIL, Lausanne. Elle a été cultivée en milieu DMEM, high glucose, GlutaMAX (TM) (Thermofisher 61965026) 10% sérum plus pénicilline-streptomycine.

Les cellules ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂. Les cellules ont été régulièrement testées pour l'absence de mycoplasmes (kit MycoAlert, Lonza).

Isolation des lymphocytes T humains et des cellules sanguines mononucléées (PBMC)

Les patients prélevés pour ce travail faisaient partie des cohortes BIORISE (NCT03252717) et REQUITE. L'étude BIORISE est une étude prospective multicentrique cherchant à identifier des biomarqueurs de toxicité radio-induite chez des patients traités pour des cancers du sein. L'étude REQUITE est une étude européenne prospective multicentrique cherchant également à identifier des biomarqueurs de toxicité radio-induite chez des patients traités pour des cancers du sein, de la prostate ou du poumon. Dans les deux cas, après validation par le comité d'éthique, les patients avaient signé des consentements éclairés de participation à l'étude et d'utilisation des prélèvements à des fins de recherche.

Les cellules issues de patient ont été obtenues à partir de prélèvement de sang total réalisé sur des tubes BD Vacutainer avec EDTA.

Pour les lymphocytes T :

- des rosettes RosetteSep™, human T cell enrichment cocktail (Stemcell, #15061) (750µL de rosettes pour 15mL de sang total) ont été ajoutées au sang total. Après incubation de 20 minutes, un volume équivalent de PBS 1X 2% SVF stérile (DPBS 1X Gibco, 14190-094 et Sérum de Veau Fœtal, Eurobio, CVSUF00-01) a été ajouté au tube. A l'aide d'une pipette, 20mL de milieu à gradient de densité (Lymphoprep de Stemcell, #1114547) a été ensuite déposé au

fond du tube Falcon. Le lymphoprep s'est ainsi retrouvé en dessous de ce mélange sang-rosette-PBS.

Pour les PBMC :

- un volume équivalent de PBS 1X 2% SVF stérile (DPBS 1X Gibco, 14190-094 et Sérum de Veau Fœtal, Eurobio, CVSXF00-01) a été ajouté au tube contenant le sang. A l'aide d'une pipette, 20mL de milieu à gradient de densité (Lymphoprep de Stemcell, #1114547) a été ensuite déposé au fond du tube falcon

Ensuite, dans les 2 protocoles :

Les tubes ont été ensuite centrifugés 20 minutes à 2000 rpm (rotations par minute) sans frein. Suite à la centrifugation, un gradient de densité se forme séparant ainsi les globules blancs des globules rouges et du plasma sous la forme d'un anneau présent à l'interface entre la couche de lymphocytes et de plasma. L'anneau de lymphocytes T (ou les PBMC) a ensuite prélevé puis lavé avec du PBS 1X 2% SVF stérile et centrifugé 5 minutes à 2000 rpm avec frein. Pour finir le culot cellulaire a été resuspendu dans 8 mL de milieu RPMI Medium 1640 - GlutaMAX™ (Thermofisher 61870-010) + 20% SVF (sans antibiotiques). Ces cellules ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂.

Protocole d'irradiation

Les cellules ont été irradiées 24h après leur mise en culture avec un irradiateur pré-clinique à rayons X, le Xenx de la société Xstrahl, sur la plateforme d'Irradiation Expérimentale ICM/IRCM. L'irradiation a été délivrée par dose unique avec une énergie de 225 kV (kiloVolt), une distance à la source de 35 cm, correspondant à un débit de dose de 2,7 Gy/min.

Extraits protéiques et surnageants des lymphocytes T

Quarante-huit heures après l'irradiation (soit 72 heures après la mise en culture, que cela soit pour les cellules irradiées ou les contrôles non irradiés), les cellules ont été transférées en Eppendorf et centrifugées pendant 5 minutes à 2300 rpm. Le culot cellulaire de cette première centrifugation a été utilisé pour la réalisation d'extraits protéiques, et le surnageant a été conservé pour étudier la sécrétion potentielle de la protéine PON1 par les lymphocytes dans le milieu de culture.

- Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube Eppendorf, puis centrifugé à 13 300 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant ainsi collecté a été une nouvelle fois centrifugé à 13 300 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Ce dernier surnageant a alors été conservé pour analyse.
- Le culot a été resuspendu dans du tampon RIPA (fabriqué au laboratoire) : 50mM Tris pH7,5, 150 mM NaCl, 1% NP40 (Santa Cruz, sc29102), 0.5% Na deoxycholate (Sigma, D5670), 0.1% final SDS (Sigma, 05030), inhibiteurs de protéases (Complete Tablets EDTA-free, Easy pack, #04693132001, Roche)
 - . Après homogénéisation par vortex, les tubes ont été incubés sur glace 30 minutes puis centrifugés 10 minutes à 13400 rpm à 4°C. Le surnageant récupéré après cette centrifugation a constitué l'extrait protéique.

Ces extraits obtenus ont été par la suite dosés par un test BCA (BiCinchoninic acid assay) (kit Uptima, #UP40840).

Extraction de l'ARN des lymphocytes T

Vingt-quatre heures après l'irradiation, les cellules ont été récupérées en Eppendorf puis centrifugées 5 minutes à 2300 rpm. L'ARN a été ensuite extrait à l'aide du kit RNeasy Mini kit (Qiagen Cat No./ID : 74104), selon le protocole du fabricant. Les ARNs ont été dosés avec un spectrophotomètre à microvolume, Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Test RILA

Les échantillons de patients ont été prélevés à l'aide de tubes BD Vacutainer héparinés (héparine de lithium - LH).

200µL de sang total ont été mis en culture dans 2mL de RPMI Medium 1640 - GlutaMAX™ + 20% SVF (sans antibiotiques). Le lendemain de la mise en culture, la moitié des cultures de chaque patient ont été irradiées à 8 Gy puis remises en cultures sans changer le milieu. L'autre moitié des cultures était considérée comme le contrôle non irradié (0 Gy).

Quarante-huit heures après l'irradiation, les cellules ont été transférées dans des tubes de cytométrie puis centrifugés 5 minutes à 1450 rpm. Le culot cellulaire a ensuite été repris dans 200µL de PBS 1X. Après ajout de 10 µL d'anticorps anti-human CD8-FITC (Becton Dickinson ref : 555366), les tubes ont été incubés à l'abri de la lumière à température ambiante pendant 20 minutes. Après incubation, 4 mL de tampon de lyse (Lysing Buffer (Becton Dickinson ref : 349202)) a été ajouté et les tubes ont été ré-

incubés 20 minutes à l'abri de la lumière à température ambiante. Les tubes ont ensuite été centrifugés 5 minutes à 1450 rpm et le culot a été repris dans 10 mL de tampon de lyse. Après une nouvelle centrifugation de 5 minutes à 1450 rpm, le culot a été repris dans 3 mL de PBS 1X. Après une dernière centrifugation de 5 minutes à 1450 rpm, le culot a été repris dans 200µL de PBS 1X. Dans chaque tube ont été ajoutés 5µl d'Iodure de Propidium (SM : 1mg/ml) (SIGMA ref : P-4170) et 5µl de RNase (SM : 10mg/ml) (QIAGEN ref : 19101) puis les tubes ont été conservés à 4°C jusqu'à la lecture au cytomètre Gallios.

Analyse du cycle cellulaire

Deux mL de culture cellulaire à 2.10^6 cellules/mL ont été mis en culture. Vingt-quatre heures après la mise en culture, les cellules ont été irradiées à 8 Gy (ou laissées en culture pour les contrôles non irradiés), puis remis en culture sans changer le milieu.

Quarante-huit heures après l'irradiation, les cellules ont été transférées dans des tubes de cytométrie. La procédure expérimentale a ensuite été la même que pour le test RILA (voir au-dessus), à l'exception de l'anticorps anti-CD8, qui était omis.

Analyse de l'apoptose, test Annexin V - 7AAD, par cytométrie en flux

Les lignées cellulaires ont étéensemencées à 2.10^6 cellules/mL en plaques 24 puits (0,5mL par puits). Les plaques étaient ensuite irradiées à 8 Gy. Les plaques contrôles ont été traitées de la même façon mais sans irradier les cellules. Quarante-huit heures après irradiation, les cellules ont été transférées en Eppendorf puis analysées avec le kit Annexin V - 7AAD (Beckman Coulter PN IM3614), selon le protocole du fabricant.

Brièvement, une fois transférées en Eppendorf, les cellules ont été lavées dans du PBS 1X à 4°C puis centrifugées à 500g pendant 5 minutes. Le culot a ensuite été repris dans du Binding Buffer 1X (fourni dans le kit). L'anticorps anti-Annexin V et le 7AAD ont ensuite été ajoutés aux tubes puis mélangés à la pipette. Les tubes ont été analysés au cytomètre Gallios, après 15 minutes d'incubation à 4°C.

Dans l'étude de l'apoptose induite après irradiation sur les différents clones de Jurkat transfectées PON1, le protocole a été modifié. Le contrôle de cette étude étant la lignée Jurkat transfectées eGFP, l'anticorps anti-Annexin V couplé FITC a dû être remplacé par un anticorps avec un autre fluorochrome : l'anti-Annexin V couplé Pacific Blue™ (Thermofisher A35122).

Dans mon analyse je me suis essentiellement intéressée au pourcentage de cellules en apoptose précoce, caractérisé par l'expression positive du marquage Annexin V et l'expression négative du marquage 7AAD (AnnexinV +/7AAD-).

Transfections stables

Le plasmide lentiviral codant pour l'eGFP a été fourni par le Dr Mancini. Ce plasmide est basé sur le plasmide pLenti CMV Puro DEST (Addgene #17452) (Figure 3). Le plasmide codant pour PON1 a été créé à partir de ce dernier plasmide en utilisant le système de clonage Gateway. Brièvement, l'insert PON1 a été gracieusement fourni par l'IGMM. Il a ensuite été inséré dans le vecteur pLenti CMV Puro DEST à l'aide du kit LR Clonase II Enzyme Mix (Thermofisher).

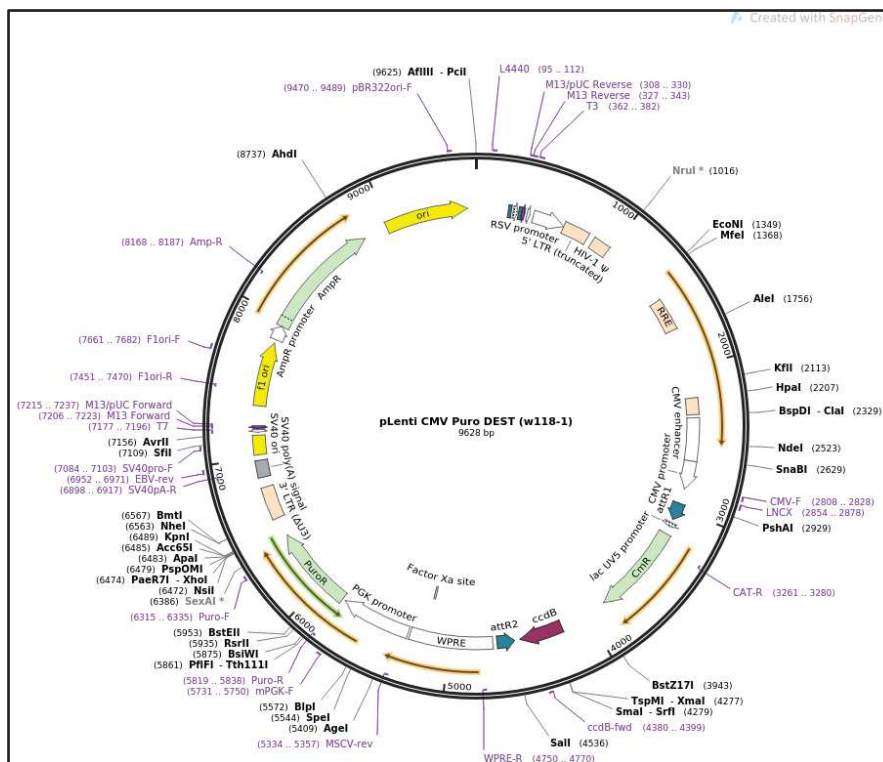


Figure 3 : Plasmide pLenti CMV Puro DEST utilisé pour les transfections stables

Le gène d'intérêt (eGFP ou PON1) a été inséré en aval du promoteur CMV. Ce promoteur permet une forte expression du transgène.

Les lentivirus ont été produits par transfection transitoire de cellules HEK293T. Brièvement, 2.10^6 cellules ont étéensemencées puis transfectées 24 et 48 heures post ensemencement. Les cellules ont été transfectées avec 25µg de PEI (Polyethylenimine Linear, Polysciences), le plasmide contenant le gène d'intérêt et deux plasmides contenant les gènes *env*, *gag* et *pol*. Quarante-huit heures après la deuxième transfection, le surnageant des cellules a été récupéré, filtré et congelé à -80°C.

Les cellules Jurkat ont été infectées par ce surnageant contenant les virions pendant 8 heures en présence de 4,8µg/mL de polybrène. Au bout de 8 heures, le milieu était retiré par centrifugation, puis remplacé par du milieu frais. Deux jours plus tard, le milieu de culture a été remplacé par du milieu frais avec antibiotique de sélection (puromycine). Après une semaine de sélection, les cellules viables ont été récupérées et la transfection a été contrôlée.

La présence de l'eGFP a été vérifiée par microscopie à fluorescence et celle de PON1 par Western blot.

Mesure indirecte des ROS

Les lignées cellulaires Jurkat et les 2 lignées Jurkat transfectées ont été ensemencées à 2.10^6 cellules/mL en plaques 24 puits (0,5mL par puits). Du N-acétyl-cystéine à 5mM final a été ajouté au milieu dans les puits traités. Trente minutes après ajout de N-acétyl-cystéine, les cellules ont été irradiées à 2, 4 ou 6 Gy. Pour le contrôle positif d'apoptose induite par les ROS, du H₂O₂ a été ajouté aux puits pour une concentration finale de 100µM, sans irradiation des cellules.

Vingt-quatre heures après irradiation (ou traitement par H₂O₂), les cellules ont été transférées en Eppendorf, puis analysées avec le kit Annexin V-7AAD, selon le protocole décrit ci-dessus.

Etude de la signalisation par Western blot

Les extraits protéiques sont dénaturés 5 minutes à 95°C en présence du tampon Laemmli (60mM Tris-CL pH6,8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% β-mercaptoéthanol, 0,01% bleu de bromophenol). Les échantillons sont ensuite déposés dans un gel de polyacrylamide (gel à 12% ou à gradient de polyacrylamide) et migrent avec un voltage de 80V à 120V (marqueur protéique ProSieve™ QuadColor™).

Le transfert a ensuite été réalisé sur membrane PVDF (Amersham, GE Healthcare) en milieu liquide, pendant 1h30 à 110V à 4°C ou en semi sec en utilisant le système Trans-Blot Turbo de Biorad suivant

la cible observée. La saturation des membranes a ensuite été faite pendant 2 heures dans du TBS-Tween 0,1% 5% lait.

L'anticorps primaire a ensuite été incubé sur la nuit à 4°C. Après lavage des membranes dans du TBS-Tween 0,1%, les anticorps secondaires ont, quant à eux, été incubés pendant 1 heure à température ambiante. Après de nouveaux lavages en TBS-Tween 0,1%, la révélation des membranes s'est faite en utilisant soit le réactif Luminata Forte (Millipore, WBLUF0100) soit le réactif Immobilon® ECL Ultra Western HRP Substrate (Millipore WBULS0100).

Ces anticorps utilisés sont les suivants :

Anticorps primaires :

- PON1 : anticorps monoclonal de lapin (Abcam #2893). Dilué au 1/2000^{ème} dans du PBS-Tween 0,1%-BSA 5% (Sigma, A7906)
- Bêta-actine : anticorps monoclonal de souris (Cell signaling #3700). Dilué au 1/1000^{ème} dans du PBS-Tween 0,1%-BSA 5%
- GAPDH : anticorps monoclonal de lapin (Cell signaling #5174). Dilué au 1/1000^{ème} dans du PBS-Tween 0,1%-BSA 5%
- Alpha-tubulin : anticorps monoclonal de souris (Cell signaling #3873). Dilué au 1/1000^{ème} dans du PBS-Tween 0,1%-BSA 5%
- Caspase 3 clivée : anticorps monoclonal de lapin (Cell Signaling #9664). Dilué au 1/750^{ème} dans du PBS-Tween 0,1%-BSA 5%
- ATR : anticorps polyclonal de lapin (Abcam #ab10312). Dilué au 1/2500^{ème} dans du PBS-Tween 0,1%-BSA 5%
- Phospho-ATR (S428) : anticorps monoclonal de lapin (Cell Signaling, #2853). Dilué au 1/1000^{ème} dans du PBS-Tween 0,1%-BSA 5%
- Chk2 [EPR4325] : anticorps monoclonal de lapin (Abcam, #ab109413). Dilué au 1/30000^{ème} dans du TBS-Tween 0,1%-BSA 5%
- Phospho-Chk2 (T68) : anticorps monoclonal de lapin (Cell Signaling, #2197). Dilué au 1/1000^{ème} dans du TBS-Tween 0,1%-BSA 5%
- ATM [D2E2] : anticorps monoclonal de lapin (Cell signaling #2873). Dilué au 1/1000^{ème} dans du TBS-Tween 0,1%-BSA 5%
- Phospho-ATM (S1981) : anticorps monoclonal de lapin (Cell signaling #5883). Dilué au 1/1000^{ème} dans du TBS-Tween 0,1%-BSA 5%
- γH2AX (Ser139) : anticorps monoclonal de souris (Millipore #05-636). Dilué au 1/1000^{ème} dans du PBS-Tween 0,1% 5% lait

- PARP1: anticorps polyclonal de lapin (Abcam #ab227244). Dilué au 1/1000^{ème} dans du PBS-Tween 0,1%-BSA 5%
- Cleaved PARP1 (p25) : anticorps monoclonal de lapin (Abcam #ab32064). Dilué au 1/2000^{ème} dans du PBS-Tween 0,1%-BSA 5%

Anticorps secondaires :

- anti-lapin : anticorps polyclonal de chèvre couplé à la peroxydase de raifort (HRP) (Sigma #A0545). Dilué au 1/10000^{ème} dans du PBS-Tween 0,1%-Lait 5%
- anti-souris : anticorps polyclonal de chèvre couplé à peroxydase de raifort (HRP) (Sigma #A3763). Dilué au 1/2500^{ème} dans du PBS-Tween 0,1%-Lait 5%

Mesure de l'expression de PON1 par ELISA

Le taux de PON1 dans les surnageants de culture lymphocytaires a été dosé en utilisant le kit ELISA Human PON1 ELISA Kit (Origene Catalog No. EA100671), en suivant les instructions du fabricant. Chaque échantillon a été réalisé en duplicat. La concentration de PON1 a été calculé grâce à la gamme étalon de la protéine humaine recombinante PON1, présente dans le kit. Le contrôle utilisé était du milieu RPMI Medium 1640 - GlutaMAX™ + 20% SVF (sans antibiotiques).

Brièvement, les échantillons ont été incubés sur la plaque fournie par le kit (précoatée avec de l'anticorps anti-PON1) à 37°C pendant 30 minutes. Après avoir vidé les puits, mais sans laver la plaque, un anticorps anti-PON1 biotinylé a été ajouté dans les puits, puis la plaque a été réincubée à 37°C pendant 60 minutes. Les puits ont ensuite été vidés et lavés dans du TBS 0,01M. Après lavage, de la solution ABC (Avidin-Biotin-Peroxidase Complex, solution fournie dans le kit) a été ajoutée dans les puits, puis incubée à 37°C pendant 30 minutes. Après de nouveaux lavages au TBS 0,01M, une solution de coloration TMB (fournie dans le kit) a été ajoutée dans les puits. Après 30 minutes d'incubation à 37°C à l'abri de la lumière, la solution TMB Stop (fournie dans le kit) a été ajoutée aux puits.

La plaque a ensuite été lue au spectrophotomètre (Multiskan Ex Thermofisher) à 450nm.

Etude de l'expression de l'ARN messager de PON1 et CHK1 par RT-qPCR

L'ARN des lymphocytes T ou des PBMC de patients a été extrait comme décrit précédemment. 1µg d'ARN totaux ont été rétrotranscrits à l'aide du kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase

(ThermoFisher, 18080-044) et de random primers selon le protocole du fabricant. Brièvement, 1µg d'ARN a été mélangé à 200ng de Random Primers et 1 µl dNTP Mix 10 mM. L'ensemble a été chauffé à 65°C pendant 5 minutes puis refroidi sur glace pendant 1 minute. A ce tube a ensuite été ajouté 4 µl de 5X First-Strand buffer, 1 µl 0,1M DTT, 1 µl RNase Out 40 U/µl, 1 µl SuperScript III RT (200 U/µl) (tous les produits sont fournis dans le kit). La réaction de réverse transcription a ensuite été réalisée au thermocycleur selon le protocole suivant :

- 25°C pendant 5 min (hybridation des Random Primers)
- 50°C pendant 60 min
- 70°C pendant 15 min (inactivation de la réaction)

Les échantillons de cDNA ainsi obtenus ont été ensuite dilués entre 1/10^{ème} et 1/20^{ème} suivant le gène cible à amplifier. Les amorces ont, quant à elles, été diluées au 1/20^{ème}. La qPCR a été réalisée avec le kit SYBR Premix Ex Taq (Takara, RR420L) selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, le SYBR Master Mix 2X (fourni dans le kit) a été mélangé avec le cDNA dilué et les amorces diluées. Le mélange a ensuite été déposé dans une plaque 384 puits, chaque condition étant déposée en triplicats. La réaction de PCR en temps réel (qPCR) a ensuite été mesurée avec le LightCycler480 (Roche) selon le protocole suivant : 20sec à 95°C, 15 sec à 60°C et 20sec à 72°C. Les données ont été analysées avec le logiciel LightCycler 480 software release 1.5.0, par quantification absolue avec la méthode de 2^{nde} derivative max en se basant sur une gamme de cDNA « contrôle » contenant le gène d'intérêt.

Les amorces utilisées ont été conçues grâce à l'outil en ligne, primer-Blast NCBI du NIH. Une fois les séquences définies ils ont été synthétisé par Eurofins :

Gène	Séquences des amorces (5'-3')
PON1	#1FOR : CACATGTGTGTATCGCTGCC #1REV : AGTCCCTGGGTGAGTACTGG
CHK1	#1FOR : GGTGAATATAGTGCTGCTATGTTGACA #1REV : TTGGATAAACAGGGAAGTGAACAC
18S	#1FOR : GGC GCCCCTCGATGCTCTTA #1REV : GCTCGGGCCTGCTTTGAACACTCT
ATR	#1FOR : CAGCTTTGTGCCATTTACTG #1REV : CTACCTCAATTCCAAGCACA

Activation des PBMC et des lymphocytes T *in vitro*

Isolation des cellules

Les cellules ont été purifiées à partir de poches de couche leuco-plaquettaire commandées à l'Etablissement Français du Sang (EFS).

Pour les PBMC : 10mL de sang total a été ajouté dans un Falcon de 50mL, avec 10mL de PBS 1X, puis les tubes ont été mélangés par inversion manuelle. L'ensemble a été transféré dans un tube SepMate™-50 PBMC Isolation Tube (Stemcell #85450) puis 15mL de Lymphoprep (Stemcell, #1114547) a été ajouté par-dessus le mélange. Le tube a ensuite été centrifugé à 1200 g pendant 10 minutes. Après centrifugation, un gradient de concentration se forme dans le tube avec, sur le dessus, le plasma, puis en dessous un anneau contenant les PBMC, et enfin, en dessous de le SepMate, les globules rouges et les granulocytes. L'anneau contenant les PBMC a donc été récupéré et transféré dans un nouveau tube de 50mL. Après 2 lavages par 50mL de PBS 1X 2% SVF stérile (centrifugation 4 minutes à 1200 g puis conservation du culot cellulaire), 50mL de chlorure d'ammonium 1X a été ajouté au culot cellulaire. Après incubation sur glace 2 minutes, les tubes ont été centrifugés 4 minutes à 1200 g, puis le culot a été lavé 3 fois par du PBS 1X 2% SVF stérile.

Pour les lymphocytes T : 10mL de sang total a été ajouté dans un Falcon de 50mL, avec 500µL de RosetteSep™, human T cell enrichment cocktail (Stemcell, #15061). Après agitation manuelle, les tubes ont été incubés à température ambiante pendant 20 minutes. Ensuite, 10mL de PBS 1X a été ajouté au tube, puis mélangé par inversion manuelle. L'ensemble a été transféré dans un tube SepMate™-50 PBMC Isolation Tube (Stemcell #85450) puis 15mL de Lymphoprep a été ajouté par-dessus le mélange. Le tube a ensuite été centrifugé à 1200 g pendant 10 minutes. Après centrifugation, un gradient de concentration se forme dans le tube avec, sur le dessus, le plasma, puis en dessous un anneau contenant les lymphocytes, et enfin, en dessous de le SepMate, les globules rouges et les granulocytes. L'anneau contenant les PBMC a donc été récupéré et transféré dans un nouveau tube de 50mL. Après 2 lavages par 50mL de PBS 1X 2% SVF stérile (centrifugation 4 minutes à 1200 g puis conservation du culot cellulaire), 50mL de chlorure d'ammonium 1X a été ajouté au culot cellulaire. Après incubation sur glace 2 minutes, les tubes ont été centrifugés 4 minutes à 1200 g, puis le culot a été lavé 3 fois par du PBS 1X 2% SVF stérile.

Les culots cellulaires ainsi récupérés ont été repris dans du milieu RPMI Medium 1640 - GlutaMAX™ (Thermofisher 61870-010) + 10% SVF (sans antibiotiques).

Activation des cellules

Les plaques de culture ont été pré-coatées avec un anticorps anti-CD3 et un anticorps anti-CD28. Pour cela, 3mL de solution d'anticorps anti-CD3 (Bio X Cell #BE0001-2) a été dilué dans du PBS 1X stérile afin d'obtenir une concentration de 9µg/mL. Dans chaque puits d'une plaque 6 puits, 700µL de cette solution a été ajouté (700µL de PBS 1X pour les puits contrôle). La plaque a ensuite été incubée à 37°C pendant 2 heures. Les puits ont ensuite été lavés avec 1mL de PBS 1X stérile.

Après comptage cellulaire, 2.10^6 /mL cellules ont étéensemencées dans du milieu RPMI Medium 1640 - GlutaMAX™ + 10% SVF + anticorps anti-CD28 (Bio X Cell #BE0248) à 2µg/mL à raison de 2mL par puits. Dans chaque puits, 2µL de β-mercaptoéthanol (Sigma-Aldrich M6250) a ensuite été ajouté. Les cellules ont ensuite été maintenues en culture dans ces conditions pendant 3 à 4 jours à 37°C.

A la fin de la période d'incubation, le cycle cellulaire des cellules a été analysé tel que décrit ci-dessous et des extraits protéiques totaux ont été réalisés selon la procédure décrite précédemment.

Analyse du cycle cellulaire des PBMC et des lymphocytes T

Le contenu des puits de culture cellulaire a été récupéré et transféré dans des tubes des cytométrie. Après centrifugation 5 minutes à 1100 rpm, le surnageant a été éliminé et le culot cellulaire a été repris dans 2mL de PBS 1X. Après une nouvelle centrifugation de 5 minutes à 1100 rpm, le culot cellulaire a été repris dans 500µL d'éthanol à 75%. Après incubation à température ambiante pendant 3 minutes, 1mL de PBS 1X a été ajouté dans le tube. Après centrifugation 5 minutes à 1100 rpm, le surnageant a été éliminé et le culot cellulaire a été repris dans 1mL de PBS 1X et incubé à 4°C sur la nuit.

Le lendemain, après centrifugation 5 minutes à 1100 rpm, le culot cellulaire a été repris dans 500µL de solution de marquage (Iodure de Propidium (Sigma Aldrich P4170) 0,4mg/mL final, RNase (QIAGEN ref : 19101) 0,1mg/mL final in PBS 1X) et incubé quelques minutes à température ambiante. Les tubes ont ensuite été analysés au cytomètre Gallios.

Analyse statistique

Les données des WB et des tests ELISA (Figures 7 et 16) ont été analysées grâce au test t de Student pour échantillons appariés.

Résultats et discussion

Partie 1 : Résultats préliminaires

1.1 Le RILA est modifié par des facteurs présents dans le surnageant lymphocytaire

Des travaux préliminaires réalisés dans notre équipe ont cherché à mettre en évidence des facteurs pouvant modifier le résultat du test RILA. En modifiant plusieurs facteurs lors de l'expérimentation (changement de milieu après l'irradiation ou expérimentation sur les lymphocytes seuls par exemple), nous avons mis en évidence que, lorsque le RILA était réalisé sur des lymphocytes T purifiés, le changement du milieu après irradiation modifiait le résultat du RILA, alors que ce n'était pas le cas sur le sang total (Figure 4).

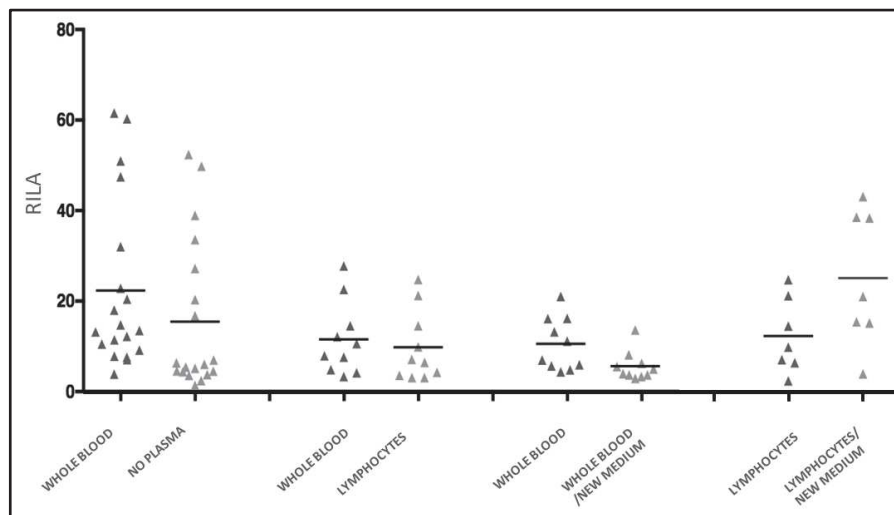


Figure 4 : Analyse des facteurs influençant le résultat du RILA

Les données en abscisse correspondent à la modification par rapport à la procédure initiale du RILA. La ligne « no plasma » correspond à du sang total remis en culture après séparation du plasma par centrifugation (les érythrocytes et les cellules mononuclées ont ainsi été conservées). Les lignes « lymphocytes » correspondent à la procédure du RILA réalisée sur des lymphocytes T purifiés. Les lignes marquées « new medium » correspondent à un changement de milieu juste après l'irradiation à 8 Gy et un deuxième changement de milieu 24h après.

Cette donnée nous a permis de mettre en évidence qu'un facteur sécrété par les lymphocytes était probablement protecteur de l'apoptose radio-induite puisqu'un changement de milieu après l'irradiation augmentait le taux de RILA.

1.2 PON1 est associé aux patients présentant un RILA faible

En partant de cette observation, le laboratoire a décidé de faire analyser des échantillons de surnageant lymphocytaire des patients en spectrométrie de masse par la plateforme de spectrométrie de l'Unité de Recherche Translationnelle de l'ICM. Cette analyse a été réalisée sur 6 patients : 3 avec un RILA faible (inférieur à 6) et 3 avec un RILA élevé (supérieur à 18). La protéine PON1 a été identifiée chez les 3 patients de RILA faible mais était totalement absente chez 2 des 3 patients à RILA élevé (Figure 5). Lors de cette analyse, sur l'ensemble des protéines étudiées, aucune autre ne semblait différemment exprimée dans les deux groupes de patients.

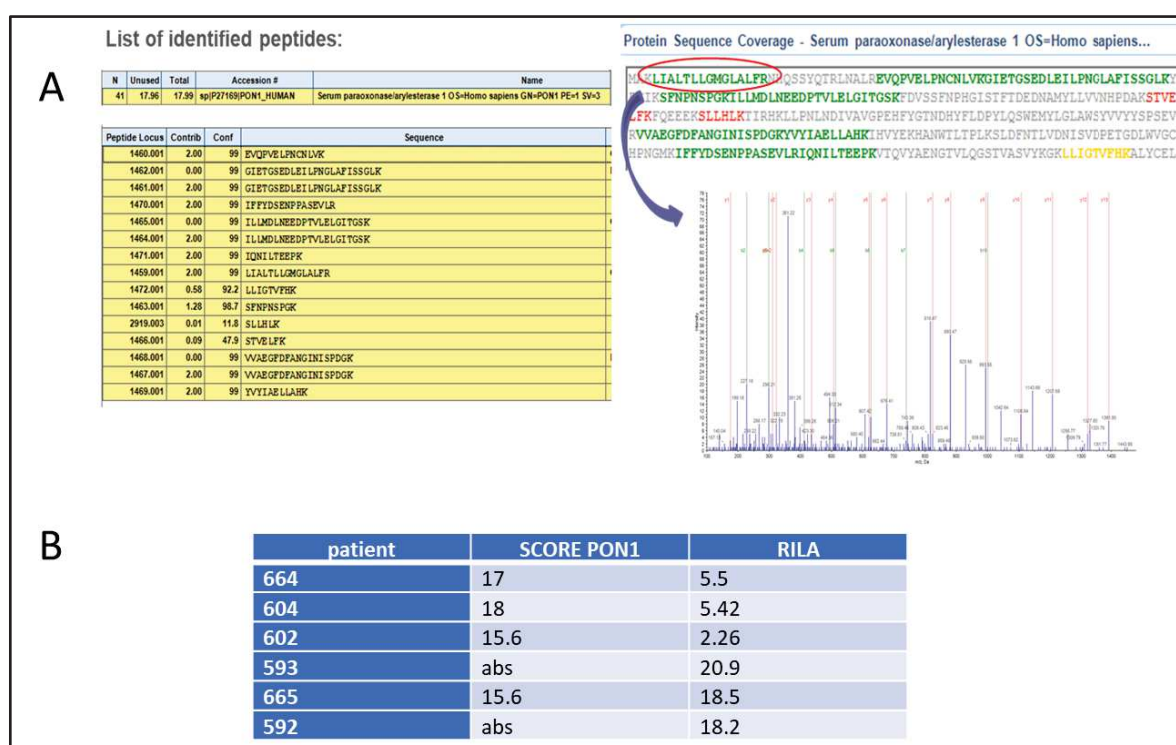


Figure 5 : Analyse par spectrométrie de masse des échantillons de surnageant lymphocytaire de patients

Les surnageants de lymphocytes irradiés pour le RILA ont été analysés sur colonne WIDE PORE C18 3UM 10CMx0,50mm DISCOVERY. A. PON1 a été identifié par 8 peptides uniques avec un index de confiance $\geq 99\%$ obtenu par ProteinPilot (score ProteinPilot ≥ 2). B. Score PON1 obtenu pour les différents patients. Le numéro de patient correspond au numéro d'inclusion dans l'étude BIORISE.

1.3 PON1 est exprimé et sécrété par les lymphocytes T

1.3.1 Expression basale

Afin de confirmer cette observation, des analyses par Western blot (WB) ont été réalisées sur des surnageants et des extraits protéiques de lymphocytes T obtenus par purification de sang total de patients prélevés pour réaliser des tests RILA. Les lymphocytes T ont été purifiés puis mis en culture, et les extraits protéiques ont été réalisés au bout de 48 heures.

Nous avons ainsi pu observer que PON1 était bien exprimé au niveau lymphocytaire chez certains des patients (Figure 6).

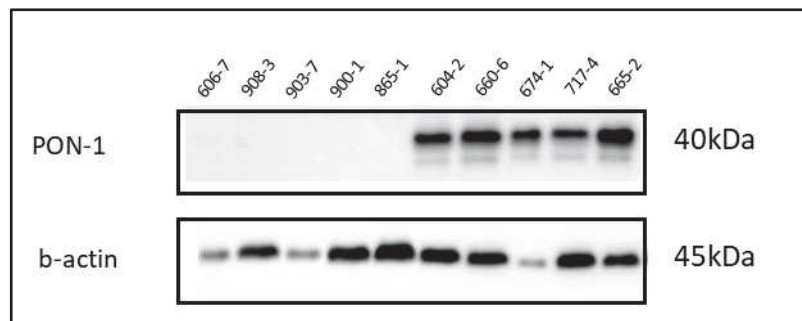


Figure 6 : Expression de PON1 par les lymphocytes T humains

Analyse en WB sur des extraits protéiques totaux issus de lymphocytes T humains non irradiés. Les numéros des échantillons correspondent au numéro d'inclusion des patients dans l'étude BIORISE. PON1 n'est présent que chez 5 des 10 patients analysés.

Bien que, dans la littérature, l'expression de PON1 n'ait été décrite qu'au niveau du foie et des reins, PON1 est donc bien exprimé au niveau lymphocytaire, et pas seulement au niveau du foie et des reins. Cependant, cette expression ne semble pas présente chez l'ensemble des patients testés.

1.3.2 Expression après irradiation

Nous avons par la suite cherché à voir si l'irradiation modifiait l'expression de PON1 dans les lymphocytes. Après mise en culture, les lymphocytes T de patients ont donc été irradiés à 8 Gy (ou non, pour les contrôles à 0 Gy) puis remis en cultures. Les extraits protéiques ont été réalisés 48 heures après irradiation.

En comparant des extraits de lymphocytes T irradiés à 8 Gy aux témoins non irradiés, nous avons pu mettre en évidence que l'expression de PON1 semble très légèrement augmentée après irradiation (Figure 7). La différence d'expression entre 0 et 8 Gy était statistiquement significative sur cet échantillon de patients ($p=0,001$).

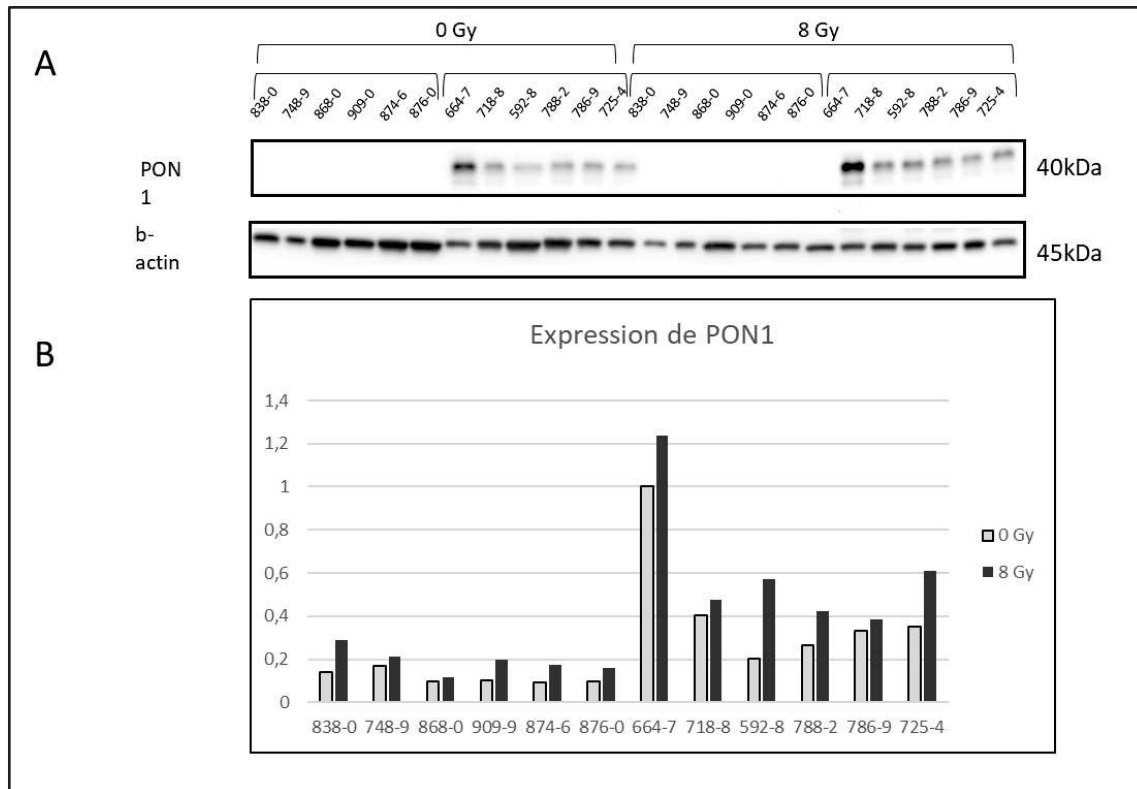


Figure 7 : Expression de PON1 par les lymphocytes T humains après irradiation

A. Analyse en WB sur des extraits protéiques totaux issus de lymphocytes T humains non irradiés ou irradiés à 8 Gy. Les extraits protéiques ont été préparés 48 heures après irradiation. Les numéros des échantillons correspondent au numéro d'inclusion des patients dans l'étude BIORISE. B. Quantification de l'expression de PON1 rapportée à celle de la β -actin. Le niveau d'expression a été normalisé sur le niveau d'expression du patient 664-0 à 0 Gy.

PON1 est aussi observée par WB dans les surnageants lymphocytaires des patients chez qui il est présent dans les extraits protéiques (résultats non présentés ici). En se basant sur ces résultats, ainsi que sur ceux de la spectrométrie de masse (Figure 5), nous avons donc démontré que cette protéine est non seulement exprimée, mais également sécrétée par les lymphocytes T CD8 humains.

1.4 Conclusion des résultats de cette partie

Comme observé, PON1 est bien exprimée et sécrétée par les lymphocytes T chez certains patients, en particulier ceux présentant un taux de RILA faible. Cette expression semble légèrement augmentée après irradiation. Cependant, ces observations ont été réalisées sur des effectifs relativement faibles et nécessitent confirmation à plus grande échelle.

D'autre part, afin d'étudier l'expression de PON1 dans les lymphocytes, il est nécessaire d'avoir un modèle d'étude reproductible : en effet, il est difficile de répéter les expérimentations sur les patients car elles nécessitent du sang frais, et cela demanderait de reprélever les patients de façon répétée, et donc de les faire venir sur l'hôpital en dehors du contexte de leur maladie. Sur le plan éthique, cette position est difficile à défendre, même dans le cadre d'un essai clinique.

Nous avons donc par la suite tenté de développer un modèle cellulaire du RILA afin de pouvoir répéter et moduler les expériences

Partie 2 : Développement du modèle cellulaire

2.1 Mise au point du RILA sur les lignées cellulaires

2.1.1 Choix du modèle cellulaire

Le test RILA étudiant l'apoptose radio-induite des lymphocytes T, nous nous sommes intéressés à des lignées de lymphocytes T immortalisés. Les lignées Jurkat et HPB-ALL sont toutes les deux des lignées immortalisées issues de leucémies aiguës lymphoblastiques T. Nous avons fait le choix d'utiliser ces 2 lignées car la lignée Jurkat n'exprime pas PON1, alors que la lignée HPB-ALL l'exprime (Figure 8).

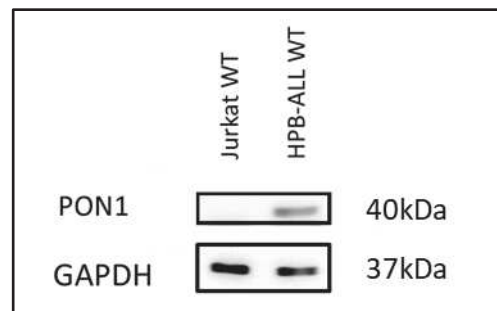


Figure 8 : Expression de PON1 par les lignées cellulaires

Extraits protéiques totaux issus des lignées Jurkat et HPB-ALL.

2.1.2 « RILA » cellulaire

La procédure expérimentale du RILA a été modifiée pour s'adapter aux lignées cellulaires. En effet, étant donné que le RILA consiste en l'analyse de la population de lymphocytes T CD8 en phase subG1, nous avons choisi de réaliser une analyse directe du cycle cellulaire sur nos lignées pour en identifier la population subG1 48 heures après irradiation à 8 Gy. La comparaison entre le taux de cellules en phases subG1 après irradiation à 8 Gy, comparée au témoin, a donc été assimilée aux résultats du RILA (Figure 9).

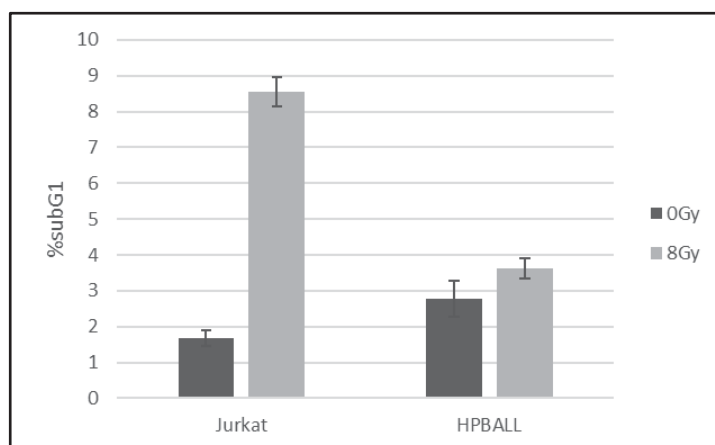


Figure 9 : « RILA » cellulaire

Le pourcentage de cellules en phase subG1 est indiqué en valeur absolue, sans irradiation et 48 heures après irradiation à 8 Gy.

Le taux de cellules en phase subG1 après irradiation est bien inférieur dans la lignée HPB-ALL par rapport à la lignée Jurkat. Etant donné que cette lignée est celle qui exprime PON1, cela semble corroborer les résultats obtenus chez les patients, où PON1 est plutôt exprimée chez les patients à RILA faible (et donc à faible taux d'apoptose lymphocytaire après irradiation).

Cependant, cette analyse du cycle cellulaire a rapidement été limitée. En effet, l'utilisation de drogues sur les lignées cellulaires rend l'interprétation du cycle cellulaire très difficile, en modifiant la répartition des cellules entre les différentes phases du cycle. L'analyse directe des cellules en phase subG1 apparaît donc peu reproductible et surtout peu fiable après éventuels traitements. Nous avons donc cherché un test plus fiable pour mesurer la population cellulaire en apoptose après irradiation.

2.1.3 Analyse directe de l'apoptose

Notre intérêt s'est donc porté sur le test Annexin V - 7AAD. Ce test est basé sur la détection de la phosphatidylsérine à la surface des cellules. Ce phospholipide, d'habitude retrouvé sur la face intracellulaire de la membrane plasmique, est extériorisé durant les premières étapes de l'apoptose (par déstabilisation de la membrane plasmique). L'Annexin V se lie à la phosphatidylsérine et sa détection permet donc d'identifier les cellules en apoptose précoce. Le 7AAD (7-Aminoactinomycin D), quant à lui, est un marqueur de viabilité cellulaire : il se lie à l'ADN mais ne peut être intériorisé qu'après perte de l'intégrité des membranes cellulaires. Il est donc utile pour détecter les cellules en apoptose tardive ou en processus de nécrose. L'utilisation combinée de l'Annexin V et du 7AAD permet

donc d'identifier les cellules viables (Annexin V- 7AAD-) des cellules en apoptose précoce (Annexin V+ 7AAD-) et en apoptose tardive (Annexin V+ 7AAD+).

De façon similaire à l'analyse du « RILA » cellulaire, les cellules Jurkat et HPB-ALL ont donc été mises en cultures puis irradiées à 8 Gy. Quarante-huit heures après l'irradiation, le double marquage Annexin V-7AAD a été réalisé sur les cellules afin d'identifier la population en apoptose.

En comparant les résultats de l'analyse du cycle cellulaire (« RILA » cellulaire) et ceux du test Annexin, bien que les valeurs absolues des taux de cellules en apoptose soient très différentes, la différence entre les 2 lignées cellulaires apparait tout aussi clairement avec le test Annexin qu'avec l'analyse du « RILA » cellulaire (Figure 10). De plus, le test Annexin est bien plus reproductible que l'analyse directe du cycle cellulaire.

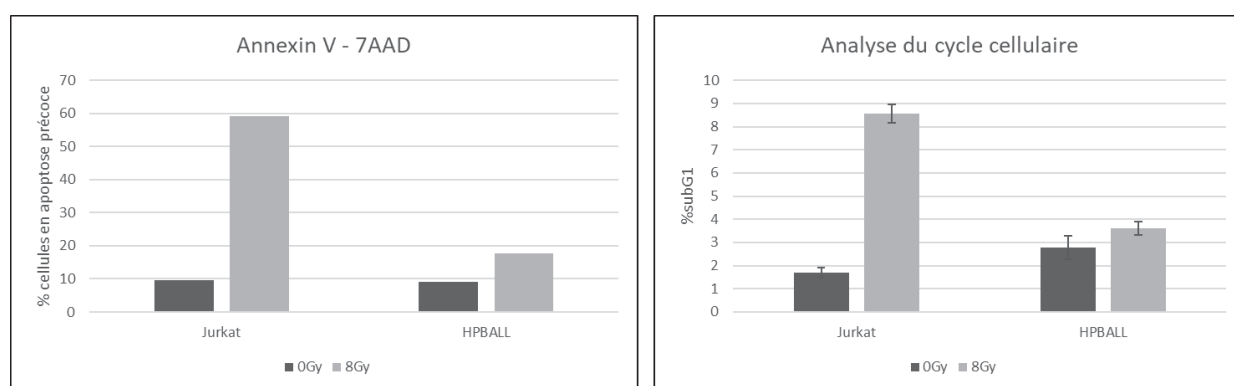


Figure 10 : Comparaison du test Annexin V - 7AAD et de l'analyse du cycle cellulaire sur les lignées Jurkat et HPB-ALL

Les cellules ont étéensemencées à 2.10^6 cellule/mL puis irradiées, ou non, à 8 Gy. L'analyse de l'apoptose a été réalisée 48 heures après irradiation. L'apoptose mesurée en Annexin correspond à l'apoptose précoce (cellules Annexin V+ 7AAD-).

L'utilisation de ce test est d'autant plus justifiée que la comparaison des résultats du RILA au test Annexin V - 7AAD a été réalisée par Azria et Oszahin sur de nombreux patients, et que les résultats sont également similaires entre les deux tests (résultats non publiés). Nous avons donc par la suite abandonné l'analyse du cycle des lignées cellulaires, au profit de l'analyse de l'apoptose par le test Annexin V - 7AAD.

2.2 Modulation de l'expression de PON1 dans les lignées cellulaires

2.2.1 Construction des lignées exprimant PON1

Forts de nos observations chez les patients et sur les lignées Jurkat et HPB-ALL, nous avons émis l'hypothèse que l'expression de PON1 était associée à un plus faible taux d'apoptose après irradiation. Afin de montrer un lien de causalité entre l'expression de PON1 et l'apoptose radio-induite, nous avons donc cherché à faire exprimer PON1 à la lignée Jurkat.

Nous avons dans un premier temps tenté de réaliser des transfections transitoires du gène PON1 dans la lignée Jurkat. Cependant, les lignées de lymphocytes T sont notoirement difficiles à transfecter de façon transitoire (taux de transfection généralement faible) et leur culture en suspension rend difficile la sélection par antibiotique (il est impossible de séparer les cellules viables des cellules mortes à moins de les cultiver plusieurs semaines, ce qui n'est pas possible sur des transfections transitoires). Nous nous sommes donc orientés vers un modèle de transfection stable. Nous avons donc réalisé une transfection stable de la lignée Jurkat à l'aide d'un plasmide lentiviral : pLenti CMV Puro DEST (Addgene #17452) avec soit le gène de l'eGFP, soit le gène de PON1 (Figure M1).

Après une semaine de culture sous pression antibiotique, nous avons récupéré deux lignées transfectées : Jurkat eGFP et Jurkat PON.

L'expression de PON1 dans les cellules ainsi transfectées a été confirmée par WB (Figure 11). La lignée Jurkat PON exprime bien la protéine PON1, contrairement au contrôle eGFP.

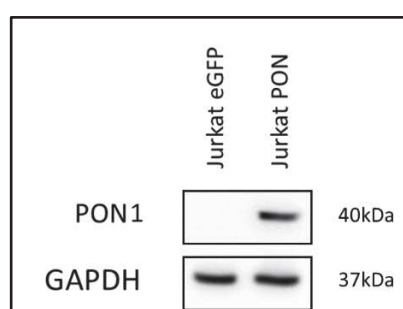


Figure 11 : Expression de PON1 par les cellules Jurkat transfectées

Jurkat eGFP : cellules transfectées avec le plasmide pLenti CMV Puro DEST eGFP. Jurkat PON : cellules transfectées avec le plasmide pLenti CMV Puro PON1. Analyse réalisée sur les populations polyclonales.

2.2.2 Etude de différents clones : expression de PON1 et apoptose radio-induite

Différents clones de la lignée transfectée Jurkat PON ont été obtenus par dilution limite. Une fois les différents clones mis en cultures, ceux-ci ont été irradiés à 4 Gy (une dose de 8 Gy aboutissant à un taux d'apoptose trop important à quarante-huit heures, ce qui rendait l'analyse impossible). Quarante-huit heures après irradiation, l'apoptose radio-induite a été analysée dans les différents clones de la lignée Jurkat-PON par test Annexin V - 7AAD (Figure 12). Cette donnée a été comparée à l'expression basale de PON1 dans les différents clones en WB.

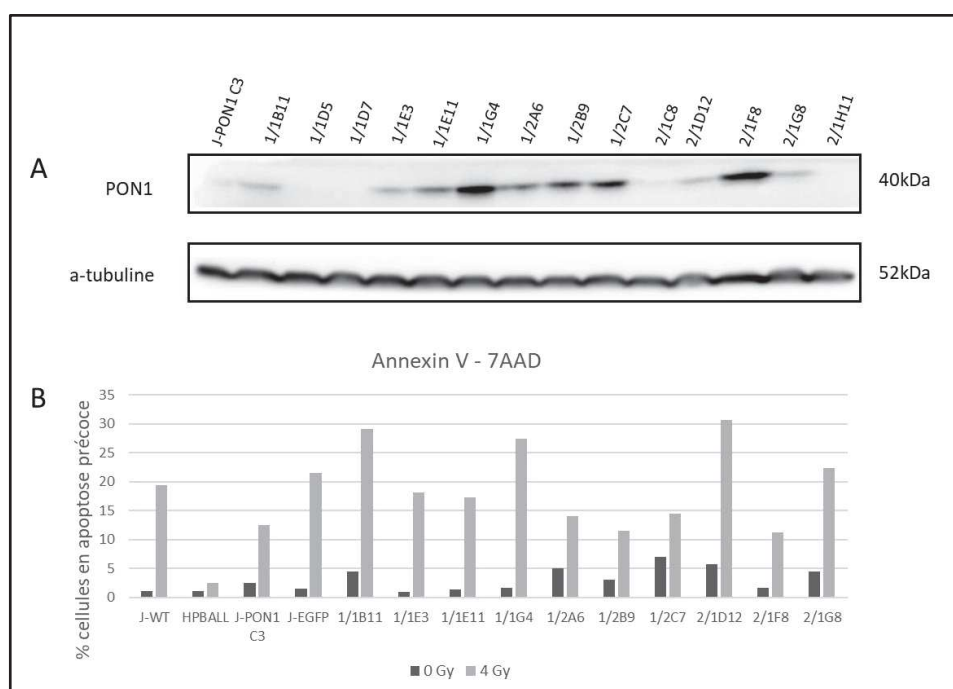


Figure 12 : Etude des clones Jurkat-PON

A : expression de PON1 par WB dans les différents clones. B : Analyse de l'apoptose précoce par Annexin V - 7AAD 48 heures après irradiation à 4 Gy. L'apoptose mesurée en Annexin correspond à l'apoptose précoce (cellules Annexin V+ 7AAD-).

Les taux d'apoptose précoce après irradiation sont différents selon les clones. Cependant, cette différence ne semble pas forcément corrélée au niveau d'expression de PON1 : par exemple, si le clone 2/1F8 exprime fortement PON1 et a un taux d'apoptose précoce inférieur aux cellules Jurkat WT après irradiation, le clone 1G4, exprimant tout aussi fortement PON1 a un taux d'apoptose supérieur au contrôle non transfecté, et au contrôle Jurkat-eGFP.

D'autre part, la différence du taux d'apoptose entre les clones exprimant PON1 et le contrôle non transfecté (WT) n'est pas significative.

2.2.3 Analyse du stress oxydant dans les clones transfectés

PON1 est, dans le plasma, impliqué dans la réduction du stress oxydatif par prévention de l'oxydation des LDL circulants. Nous avons donc émis l'hypothèse que, au niveau intracellulaire, son expression avait également un effet protecteur vis-à-vis du stress oxydant. Après irradiation, le stress oxydatif intracellulaire est principalement médié par les espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species ou ROS). Nous nous sommes donc intéressés à la variation de ces ROS après irradiation dans notre lignée exprimant PON1.

Après différents essais de kits commerciaux peu concluants, nous avons choisi de mesurer la production de ROS de façon indirecte. Cette méthode est basée sur l'analyse de l'apoptose (par quantification de la population cellulaire en subG1 ou par test Annexin V-7AAD) après irradiation, en ajoutant, ou non des anti-oxydants. En l'absence de ROS, le taux de cellules en apoptose sera le même, avec ou sans anti-oxydants. Par contre, en cas de présence de ROS intracellulaires, les anti-oxydants, en neutralisant ceux-ci, diminuent le taux d'apoptose.

Nous avons donc mis en culture nos cellules Jurkat (WT, eGFP ou PON1) en présence de N-acétylcystéine (NAC). Cette molécule est le précurseur synthétique du glutathion, qui est un puissant anti-oxydant et un des principaux agents neutralisant les ROS en intracellulaire. Après irradiation à 2, 4 ou 6 Gy, nous avons analysé l'apoptose précoce des cellules en utilisant le test Annexin V-7AAD (Figure 13).

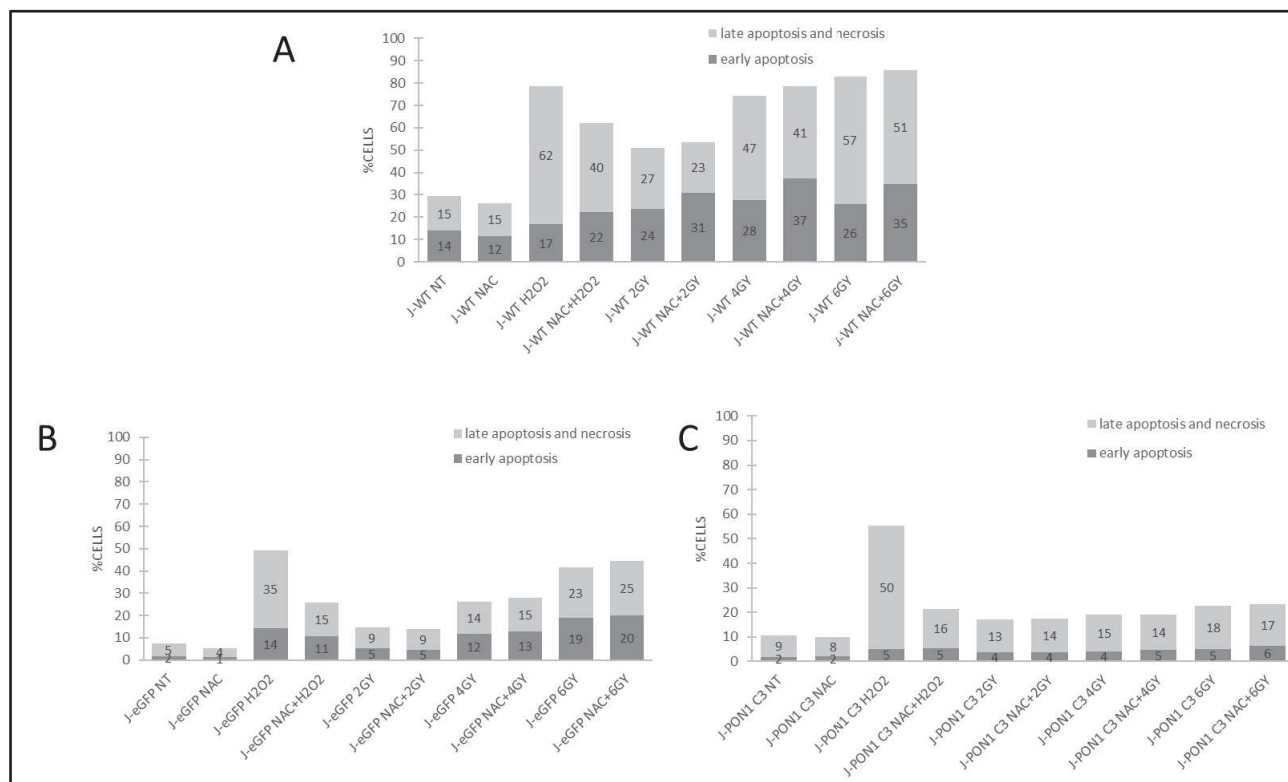


Figure 13 : Impact de la N-acétyl-cystéine sur l'apoptose radio-induite dans les lignées Jurkat

A : Population Jurkat sauvage. B : Population Jurkat eGFP. C : Population Jurkat PON1.

J-WT : lignée Jurkat sauvage, non transfectée, J-eGFP : cellules transfectées avec le plasmide pLenti CMV Puro DEST eGFP, J-PON1 C3 : clone C3 des cellules transfectées avec le plasmide pLenti CMV Puro PON1. NAC : N-acétyl-cystéine.

L'apoptose a été mesurée 24 heures après irradiation en utilisant un kit Annexin V-7AAD. La population en apoptose précoce correspond à la population Annexin V+ 7AAD-, la population en apoptose tardive à la population Annexin V+ 7AAD+. Le témoin positif d'induction d'apoptose utilisé correspond à un traitement 24 heures par de l'H2O2, puissant agent oxydant permettant la production de ROS intracellulaires.

Dans la lignée sauvage, nous pouvons observer que l'ajout d'antioxydant (NAC) permet une diminution de l'apoptose tardive (et du taux d'apoptose total) après traitement par H2O2. Après irradiation, le taux d'apoptose total n'est pas modifié, mais le ratio apoptose précoce/apoptose tardive semble légèrement augmenter, ce qui est en faveur d'un retard dans les mécanismes d'apoptose dans les cellules incubées avec le NAC. Cela confirme l'implication des ROS dans l'apoptose radio-induite dans les cellules Jurkat. Par contre, dans les cellules Jurkat eGFP comme Jurkat PON1, si l'ajout de NAC

permet une nette diminution de l'apoptose induite par le traitement par H₂O₂, aucune différence n'est visible après irradiation.

Dans notre modèle, il est donc impossible de confirmer que le PON1 produit en intracellulaire ait un rôle protecteur contre les ROS, en l'absence de différence entre nos 2 lignées transfectées.

2.2.4 Etude mécanistique des clones transfectés

L'étude des différents clones exprimant PON1 n'a pas permis d'identifier de corrélation directe entre le taux d'apoptose radio-induite et le taux d'expression de PON1 dans notre modèle. Malgré tout, étant données les résultats encourageants obtenus sur les lymphocytes de patients, nous avons voulu étudier les voies de signalisations impliquées dans la réponse à l'irradiation dans notre modèle cellulaire transfecté, afin de voir si l'expression de PON1 modifiait certains de ces mécanismes.

L'apoptose radio-induite étant médiée par la voie des caspases dans la lignée Jurkat, nous avons tout d'abord regardé le clivage de la caspase 3 après irradiation. Nous nous sommes également intéressés aux voies de réparation de l'ADN : la voie de réparation des cassures simple brin (RPA-ATR-Chk1) et la voie des cassures double brin (γ H2AX-ATM-Chk2).

La lignée sauvage et les deux lignées transfectées (clone C3 de la lignée Jurkat PON1 et population polyclonale de la lignée eGFP) ont été mis en culture et irradiés à 6 Gy. Une heure et 24 heures après irradiation, des extraits protéiques totaux ont été réalisés sur les cellules irradiées, ainsi que sur des cellules contrôle non irradiées.

L'analyse par WB de ces extraits met en évidence une nette diminution du clivage de la caspase 3 après irradiation chez le clone Jurkat exprimant PON1 (Figure 14). Cependant, il ne semble pas exister de différence dans la phosphorylation d'ATR ou de Chk2 après irradiation chez le clone PON1 par rapport à la lignée sauvage.

Par contre, on observe une augmentation de la phosphorylation basale de Chk2 chez les cellules Jurkat eGFP non irradiées, qui, paradoxalement diminue après irradiation. En analysant ce résultat à la lumière de la littérature, il a été décrit que la GFP et l'eGFP peuvent modifier les voies de signalisation intracellulaires impliquées dans l'apoptose (Ansari et al., 2016). Les cellules transfectées avec le vecteur exprimant PON1 n'exprimant pas l'eGFP, il est donc difficile de les comparer à cette lignée, qui ne peut donc être considéré comme un contrôle fiable de transfection.

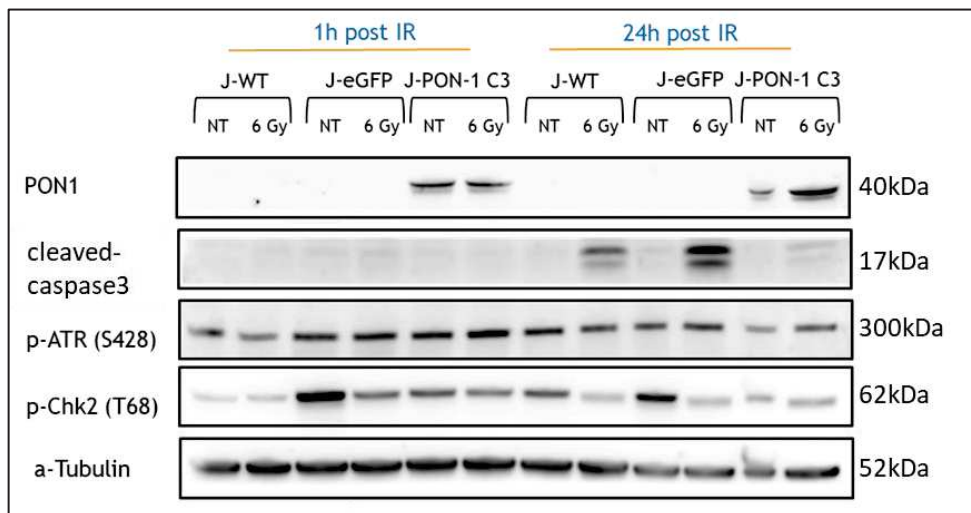


Figure 14 : Analyse des voies de signalisations radio-induites

J-WT : lignée Jurkat non transfectée, J-eGFP : cellules transfectées avec le plasmide pLenti CMV Puro DEST eGFP. J-PON1 C3 : culture monoclonale de cellules transfectées avec le plasmide pLenti CMV Puro PON1. NT : cellules non irradiées. 6 Gy : cellules irradiées à 6 Gy

Même en s'affranchissant de ce contrôle, en comparant les différents clones transfectés avec le vecteur pLenti CMV Puro PON1, leur comportement s'est avéré être très peu reproductible d'un clone à l'autre, et ce, même à taux d'expression de PON1 équivalent.

L'étude de ces clones ne permet donc pas de conclure quant à l'implication directe de PON1 dans les voies de réponse à l'irradiation, qu'il s'agisse de l'apoptose ou de la réparation de l'ADN.

2.2.5 Construction des lignées déplétées en PON1

L'expression de PON1 par la lignée Jurkat n'a pas permis de mettre en évidence un effet direct sur l'apoptose radio-induite ou les différentes voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la réponse à l'irradiation.

Nous avons donc tenté de supprimer l'expression de PON1 dans la lignée HPB-ALL, afin de voir si cette modulation aurait un effet sur l'apoptose.

Malheureusement, malgré plusieurs tentatives, transitoires ou stables (shRNA), la lignée HPB-ALL s'est avérée très difficile à transfecter, et nous n'avons pas réussi à mettre au point ce modèle.

2.3 Conclusion des résultats de cette partie

Les lignées cellulaires immortalisées Jurkat et HPB-ALL sont des modèles simples d'utilisation. Cependant, la modification de l'expression de PON1 dans ces lignées n'a pas l'effet escompté sur l'apoptose radio-induite. Ceci peut s'expliquer par le fait que la modification d'expression d'une seule protéine, dont la voie de signalisation n'est, en outre, pas connue, ne suffit pas forcément à avoir un impact significatif sur le taux d'apoptose radio-induite.

D'autre part, après analyse des voies de signalisations de l'apoptose dans ces lignées cellulaires, nous nous sommes rendus à l'évidence que ces voies étaient extrêmement altérées par rapport à des lymphocytes sains. En effet, il s'agit de lignées de lymphocytes T issues de leucémie aiguë, et immortalisées, et ayant donc une charge mutationnelle très importante. Par exemple, la lignée Jurkat est porteuse d'une mutation du gène TP53 avec défaut d'expression de la protéine p53 (Gioia et al., 2018). De même, dans la lignée HPB-ALL, l'apoptose radio-induite semble passer par des mécanismes caspase-indépendant, contrairement à ce qui est observé dans la lignée Jurkat ou les cellules saines (Nakayama Junichi et al., 2013).

Au total, bien que ces modèles soient simples d'utilisation, ils ne semblent pas refléter de façon fidèle les mécanismes impliqués dans les cellules saines. A partir de toutes ces constatations, nous avons donc décidé d'abandonner les modèles de lignées cellulaires afin de nous concentrer sur les lymphocytes sains des patients.

Partie 3 : Données humaines

3.1 Validation des résultats préliminaires

Etant donné la faible représentativité des modèles cellulaires immortalisés, nous nous sommes recentrés sur les lymphocytes sains issus de patients.

3.1.1 Expression et sécrétion de PON1 dans les lymphocytes T

Dans un premier temps, nous avons choisi de confirmer la présence de PON1 dans les surnageants et non dans les extraits protéiques lymphocytaires car il semblerait que cela soit les facteurs sécrétés qui influencent le résultat du RILA (Figure 4).

La concentration de PON1 dans les surnageants lymphocytaires de patients a été évaluée en utilisant un test ELISA spécifique de PON1. Cependant, il nous a d'abord fallu comparer la concentration de PON1 dans les surnageant lymphocytaires à celle du plasma. En effet, chez l'homme PON1 se trouve normalement dans le plasma, et sa concentration est variable d'un individu à l'autre (Mackness, 1989). Il fallait donc s'assurer que le PON1 observé dans les lymphocytes de patient n'était pas celui présent dans le plasma (et ce, d'autant plus que le milieu de culture des lymphocytes T contient 20% de SVF). Nous avons donc comparé en ELISA la concentration de PON1 dans le plasma et dans le surnageant lymphocytaire d'un échantillon de patients (Figure 15).

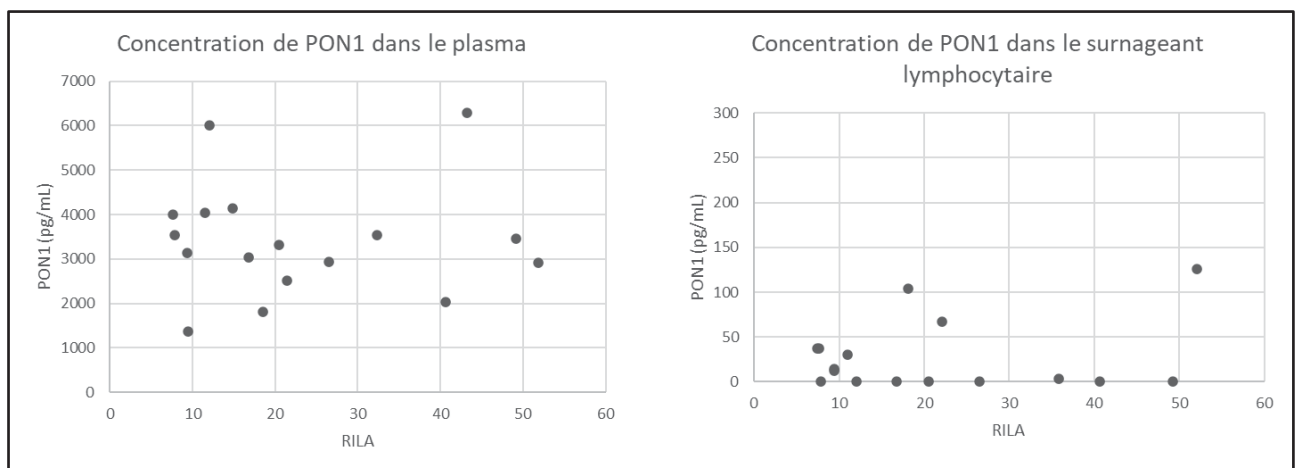


Figure 15 : concentration de PON1 dans le plasma et dans le surnageant lymphocytaire de patients

Les données sont présentées en concentration en fonction du taux de RILA. Chaque patient a été évalué pour le plasma et le surnageant lymphocytaire.

Pour le surnageant, la concentration de PON1 dans le contrôle négatif, correspondant à du milieu RPMI 20% SVF (environ 20pg/mL), a été soustraite aux concentrations mesurées. Les échantillons moins concentrés que le milieu ont été ramenés à 0.

La première observation est que l'échelle de concentration de PON1 est très différente entre le plasma par rapport au surnageant lymphocytaire (facteur 20 environ). D'autre part, si tous les patients analysés présentent du PON1 dans leur plasma, comme attendu (puisque c'est la localisation physiologique de PON1), seule une partie d'entre eux en a dans le surnageant lymphocytaire. Cela confirme les analyses WB réalisées initialement qui montrent que PON1 est sécrété par les lymphocytes, mais pas chez tous les patients (Figure 6). D'autre part, certains des patients analysés ici avaient déjà été analysés en WB, et les patients chez qui PON1 est retrouvé dans les extraits protéiques en WB sont également ceux chez qui PON1 est détecté dans le surnageant lymphocytaire. Cela confirme donc que le PON1 présent dans le surnageant lymphocytaire est sécrété par les lymphocytes. Cependant, il n'existe pas, dans notre série, de corrélation entre la concentration de PON1 dans le plasma et dans les surnageants lymphocytaire, même chez les patients pour lesquels PON1 est produit dans les lymphocytes. Cette expression semble donc indépendante de l'expression physiologique par le foie et les reins, responsable de la présence de PON1 dans le plasma.

Concernant les variations d'expression après irradiation, nous avons également validé les résultats observés en WB (Figure 7) par ELISA (Figure 16). Ceci nous a permis de confirmer que l'expression de PON1 semble très légèrement augmentée après irradiation, bien que ceci ne soit pas observé chez l'ensemble des patients. Dans cet échantillon, la différence de concentration entre 0 et 8 Gy n'était pas significative ($p=0,2$).

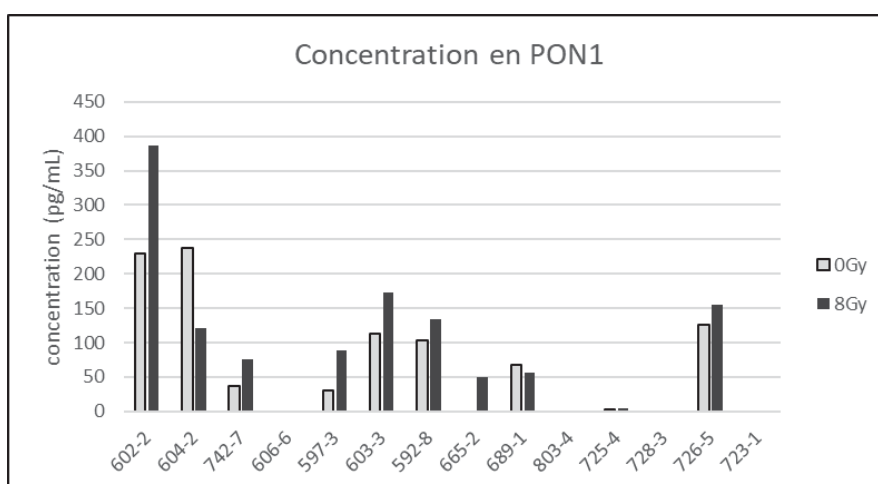


Figure 16 : Concentration de PON1 par les lymphocytes T humains après irradiation

Analyse en ELISA sur des extraits protéiques totaux issus de lymphocytes T humains non irradiés ou irradiés à 8 Gy. Les extraits protéiques ont été préparés 48 heures après irradiation. Les numéros des échantillons correspondent au numéro d'inclusion des patients dans l'étude BIORISE.

3.1.2 Corrélation entre le taux de PON1 lymphocytaire et le RILA

PON1 est donc présent et sécrété par les lymphocytes T de certains patients. Les premiers résultats tendent à montrer que cette protéine serait présente chez les patients ayant un taux de RILA faible. Cependant, cette observation avait été faite sur un tout petit nombre de patients. Afin de confirmer cette observation, nous avons mesuré la concentration de PON1 dans un plus grand nombre d'échantillons de patients. Pour cela, nous avons dosé en ELISA la présence de PON1 dans les surnageants extraits à partir des lymphocytes T purifiés de patients et mis en culture, sans irradiation. Nous avons pris le parti de tester des patients avec une large gamme de taux de RILA, afin de rechercher une éventuelle corrélation. Les résultats de ce test sont présentés dans la Figure 17.

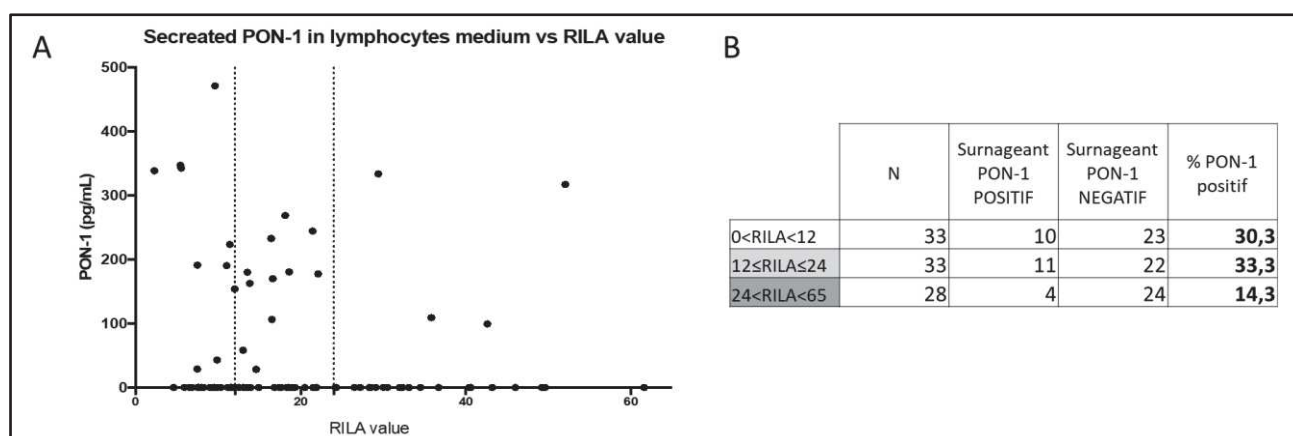


Figure 17 : Corrélation entre concentration de PON1 dans le surnageant lymphocytaire et RILA

A. Concentration de PON1 dans les surnageants lymphocytaires mesurée par ELISA. B. Synthèse des résultats. N : nombre de patients. Les valeurs seuil de RILA utilisées sont celles de la première étude prospective classant les patients en groupes de risque en fonction de leur RILA (Azria et al., 2015)

Sur les 94 patients testés, PON1 était présent dans le surnageant lymphocytaire de seulement 25 (27%). PON1 semble donc présent chez une minorité de patients. Il n'y a aucune corrélation statistique entre la concentration de PON1 dans les surnageants lymphocytaires et le taux de RILA. Par contre, en se basant sur les seuils de RILA définis dans l'étude d'Azria et al de 2015 évaluant le risque de fibrose mammaire après radiothérapie mammaire (Azria et al., 2015), nous pouvons constater que PON1 est plus rarement présent chez les patients présentant un RILA haut (supérieur à 24), ce qui confirme l'observation initiale en spectrométrie de masse (Figure 5). Aucune différence n'est par contre observée entre les groupes de RILA faible (inférieur à 12) et intermédiaire (entre 12 et 24).

3.2 L'expression de PON1 est corrélée à celle de Chk1

Les mécanismes d'action de PON1 en intracellulaires sont mal connus et ne sont pas décrits dans la littérature (Furlong et al., 2016). Comme dans les lignées cellulaires, nous avons donc cherché les différentes voies de signalisation qui pouvaient interagir avec cette protéine. Etant donné qu'il semble y avoir un lien entre l'expression de PON1 par les lymphocytes T et leur taux d'apoptose après irradiation, nous avons cherché à corréler l'expression de PON1 à diverses voies de signalisation cellulaires impliquées dans la réponse à l'irradiation.

La réponse à l'irradiation met en jeu différentes voies de réparation de l'ADN : la voie de détection et de réparation des cassures simple brin, médiée par RPA, ATR et Chk1 et des cassures double brin, médiée par γ H2AX, ATM et Chk2. Du fait de leur poids moléculaire élevé, ATM et ATR sont difficiles à détecter en WB. En revanche, les protéines Chk1 et Chk2 sont facilement détectables. Impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire et dans la réparation de l'ADN, ces protéines nous sont donc apparues comme donc des voies à explorer.

3.2.1 Analyse en WB dans les lymphocytes T

Nous avons donc tout d'abord regardé l'expression de Chk1 et sa phosphorylation chez les patients en fonction de la présence ou non de PON1 dans le surnageant lymphocytaire. Pour ce faire, nous avons réalisé des extraits protéiques totaux sur les lymphocytes T de patients purifiés et mis en culture. Nous avons pu mettre en évidence une forte corrélation entre l'expression de PON1 et celle de Chk1 (et phospho-Chk1) dans les lymphocytes T de patient (Figure 18).

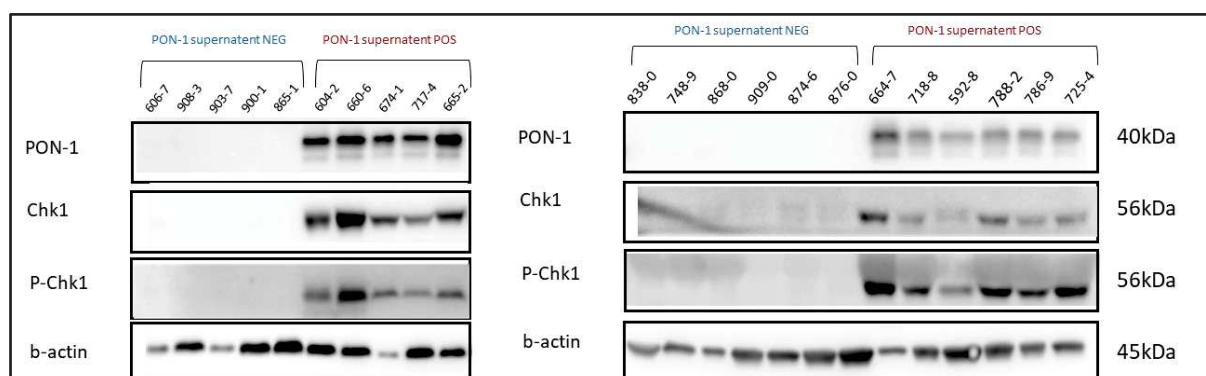


Figure 18 : Expression de PON1 et Chk1 dans les lymphocytes T humains sur 2 séries de patients
Analyse en WB sur des extraits protéiques totaux issus de lymphocytes T humains non irradiés. Les numéros des échantillons correspondent au numéro d'inclusion des patients dans l'étude BIORISE.

Chez tous les patients analysés, l'expression de PON1 est corrélée à celle de Chk1 : aucun patient n'exprimant pas PON1 n'exprime Chk1 et inversement.

3.2.2 Analyse en WB dans les PBMC

Les échantillons patients sont le meilleur sujet d'étude pour comprendre le fonctionnement du RILA. Malheureusement, avec une concentration lymphocytaire moyenne de $1 \text{ à } 2.10^6$ cellules/mL et des prélèvements limités à quelques millilitres en clinique (les tubes collecteurs standard font entre 4 et 10mL), les extraits protéiques lymphocytaires produits sont assez peu concentrés et en petit volume. Afin d'obtenir plus de matériel, nous avons étudié les PBMC des patients, qui permettent un meilleur rendement, du fait de leur concentration plus élevée.

Nous avons donc cherché à confirmer les résultats observés dans les lymphocytes dans les PBMC.

L'analyse par WB d'extraits protéiques totaux de PBMC de patients mis en culture a permis de confirmer l'observation initiale : les patients exprimant PON1 expriment Chk1 et inversement (Figure 19).

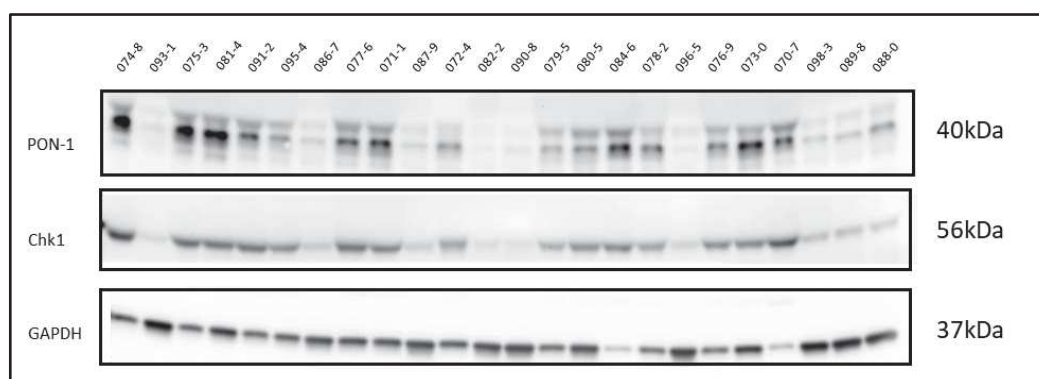


Figure 19 : Expression de PON1 et Chk1 dans les PBMC de patients

Analyse en WB sur des extraits protéiques totaux issus de PBMC humaines non irradiées. Les numéros des échantillons correspondent au numéro d'inclusion des patients dans l'étude BIORISE.

Pour analyser le reste de la cascade de signalisation de Chk1, nous nous sommes intéressés à ATR, qui se trouve en amont et est impliquée dans la détection des cassures simple brin de l'ADN. Cependant, l'analyse d'ATR par WB a été impossible car son lourd poids moléculaire (300 kDa) la rend difficile d'analyse sur des échantillons faiblement concentrés comme les nôtres.

3.2.3 Analyse par qPCR

L'expression de Chk1 semble donc corrélée à celle de PON1 dans les lymphocytes T et les PBMC de patients en WB. Cependant, cette méthode d'analyse est difficilement quantitative et peut manquer de sensibilité.

Nous avons alors tenté de confirmer ces résultats par RT-qPCR. A ce jour, nous n'avons pas réussi à détecter l'ARNm PON1 dans les échantillons lymphocytes T de patients. Nous pensons que cela est dû à une limite technique. Ces échantillons d'ARN extraits des lymphocytes sont peu concentré et parfois de qualité non optimale. Nous avons réalisé des transcriptions inverse avec de faible quantité d'ARN (0,3ng ARN totaux). Des optimisations de protocole sont envisagées pour permettre la détection de l'ARNm PON1 dans ces échantillons comme l'utilisation d'une enzyme de transcription plus performante et moins sensible aux inhibiteurs et l'utilisation d'un ARN exogène pour contrôler la présence d'inhibiteurs dans les extraits d'ARNs pouvant altérer les résultats obtenus.

Par contre, nous avons réussi dans les PBMC à mesurer l'expression de l'ARNm de PON1 ainsi que de CHK1 et ATR. A ce stade, nous avons analysé 6 extraits d'ARNs issus de PBMC montrant une expression de PON1 en western blot versus 10 extraits d'ARNs issus de PBMC ne montrant pas d'expression de PON1 en western blot.

Il s'agit de résultats préliminaires qui restent à confirmer en comparant plus d'échantillons et sur des extraits de lymphocytes si l'optimisation du protocole le permet.

L'analyse de l'expression des gènes PON1, CHK1 et ATR a donc été analysée dans les PBMC (Figure 20).

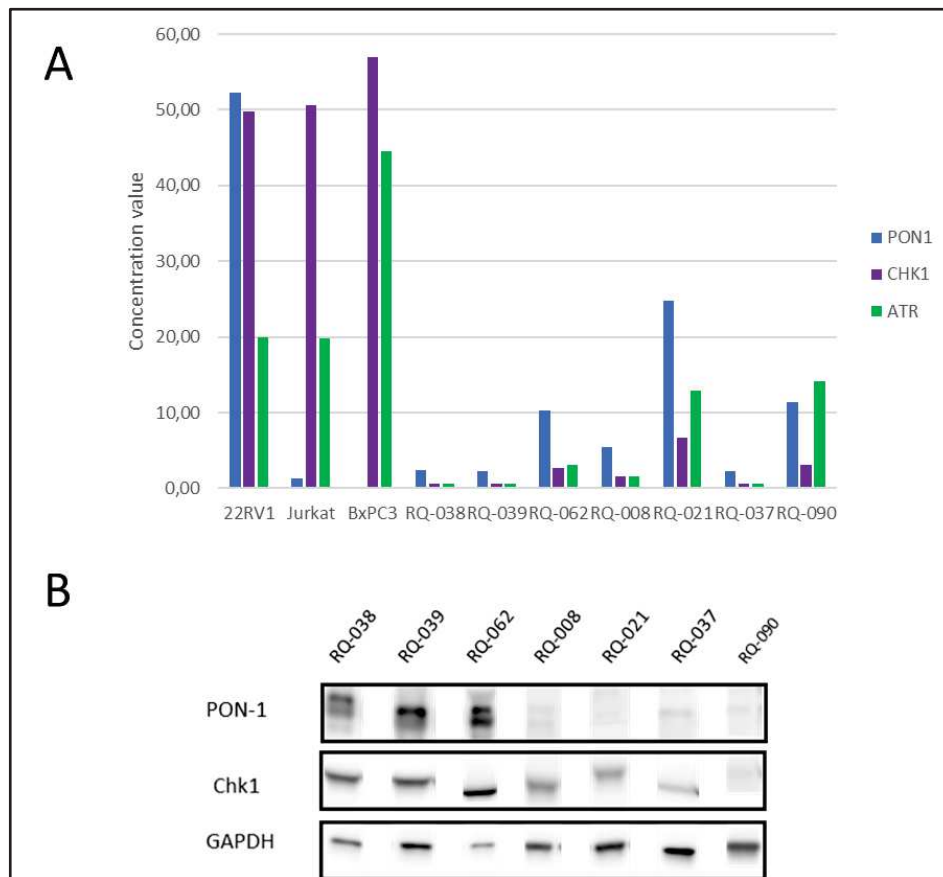


Figure 20 : Analyse de PON1, CHK1 et ATR en RT-qPCR et comparaison avec l'analyse WB

A. Analyse qPCR. Les lignées 22RV1, Jurkat et BxPC3 ont été utilisées en tant que contrôles. Pour chaque gène ciblé une gamme de dilutions d'ADN complémentaire de la lignée HPB-ALL a été utilisée permettant ainsi une analyse par quantification absolue. Les numéros en RQ sont les numéros d'inclusion des patients dans l'étude REQUITE. Le contrôle interne était l'ARN 18S. La concentration des ARNm est donc exprimée en fold change par rapport à l'ARN 18S et normalisée sur celle de l'ARN 18S du patient RQ008. Les lymphocytes des patients RQ-038, RQ-039 et RQ-062 expriment PON1 en WB. Ceux des patients RQ-008, RQ021, RQ-037 et RQ-090, non. B. Analyse WB. Analyse en WB sur des extraits protéiques totaux issus de PBMC humaines non irradiées. Les résultats proviennent de 3 membranes différentes et ont été juxtaposés à titre de comparaison avec la qPCR.

En comparant ces résultats à ceux obtenus en WB, nous n'observons pas de corrélation des résultats obtenus entre les 2 méthodes. Les premiers résultats tendent donc à montrer qu'il n'y a pas de corrélation entre l'expression de l'ARN messager et l'expression protéique de PON1. Cependant, il s'agit de résultats préliminaires qui restent à confirmer en comparant plus d'échantillons et sur des extraits de lymphocytes si l'optimisation du protocole le permet. Le message important est que l'on voit par contre toujours la corrélation PON1/Chk1.

3.3 Corrélation de l'expression de PON1 à d'autres voies de signalisations

Ayant observé une forte corrélation entre l'expression de PON1 à celle de Chk1 dans les lymphocytes T et les PBMC des patients, nous nous sommes intéressés à d'autres voies de signalisation impliquées dans la réponse à l'irradiation. Nous nous sommes tout d'abord penchés sur la voie de détection et de réparation des cassures double brin, bien étudiée dans la réponse à la radiothérapie : γ H2AX, ATM et Chk2. Nous nous sommes également intéressés à PARP, qui est également impliqué dans la détection des cassures simple brin, mais est également un marqueur précoce d'apoptose via son clivage par la caspase 3.

Nous avons donc utilisé des lymphocytes T de patients mis en culture, avec ou sans irradiation à 8 Gy. Quarante-huit heures après l'éventuelle irradiation, les extraits protéiques ont été récupérés et analysés par WB (Figure 21).

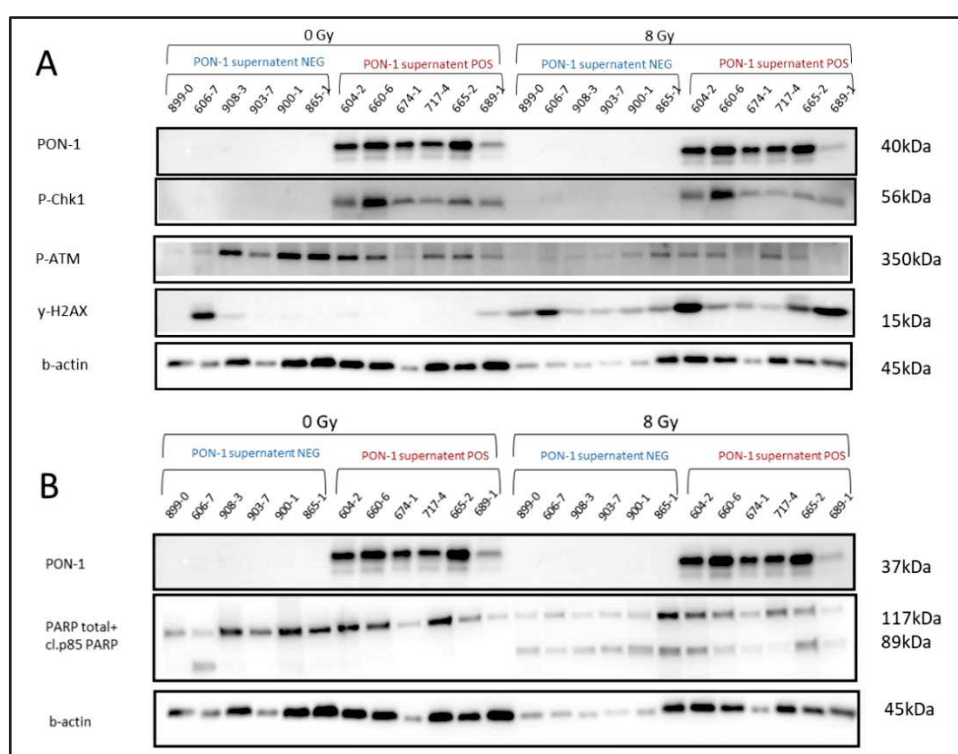


Figure 21 : Expression de différentes protéines impliquées dans la réponse à l'irradiation dans les lymphocytes T

Analyse en WB sur des extraits protéiques totaux issus de lymphocytes T humains non irradiés et irradiés à 8 Gy. Les numéros des échantillons correspondent au numéro d'inclusion des patients dans l'étude BIORISE. A. Analyse des voies de réparation de l'ADN : Chk1, ATM et γ H2AX. B. Analyse de l'apoptose : PARP total et clivage

On retrouve encore une fois la forte corrélation entre l'expression de PON1 et celle de Chk1, ici sous sa forme phosphorylée. Par contre, cette expression ne semble pas modifiée après irradiation, ni pour PON1, ni pour phospho-Chk1. Par contre, concernant la voie des cassures double brin, bien que l'on observe une augmentation de la phosphorylation de γ H2AX après irradiation dans tous les échantillons (signe de la présence et de la détection de cassures double brin après l'irradiation), il n'y a pas de corrélation entre la phosphorylation de γ H2AX et la présence éventuelle de PON1. De même, il n'y a pas de corrélation entre l'expression de phospho-ATM et celle de PON1, avant ou après irradiation.

L'expression de PON1 dans les lymphocytes ne semble pas non plus corrélée à celle de PARP total, ni à son clivage après irradiation.

Malgré la forte corrélation entre l'expression de PON1 et Chk1 dans les lymphocytes de patients, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence de lien entre l'expression de PON1 et les autres voies de réparation de l'ADN étudiées ici.

3.4 Stabilité de l'expression de PON1 dans le temps

Les patients que nous avons prélevés pour nos analyses proviennent majoritairement de l'étude BIORISE qui vise à identifier de nouveaux biomarqueurs prédictifs de toxicités tardives après radiothérapie. Les patients ont été inclus au moment de leur traitement et sont par la suite suivis sur l'hôpital dans le cadre de leur cancer. La majorité de ceux-ci sont depuis en rémission, et parfois sous traitement adjuvant (hormonothérapie pour les cancers du sein ou de la prostate par exemple).

3.4.1 Perte de l'expression de PON1 chez les patients

Afin de voir si l'expression de PON1 par les lymphocytes T est une donnée constitutive de certains patients ou résulte d'un état transitoire, nous avons reprélevé les patients revenant à l'hôpital pour leur suivi, en moyenne 2,9 ans [2,1 - 3,08] après le prélèvement initial. De façon similaire à l'analyse initiale, les lymphocytes T des patients ont été isolés à partir du sang total et mis en culture. L'analyse par WB a été réalisée sur des extraits protéiques totaux issus de ces lymphocytes (Figure 22).

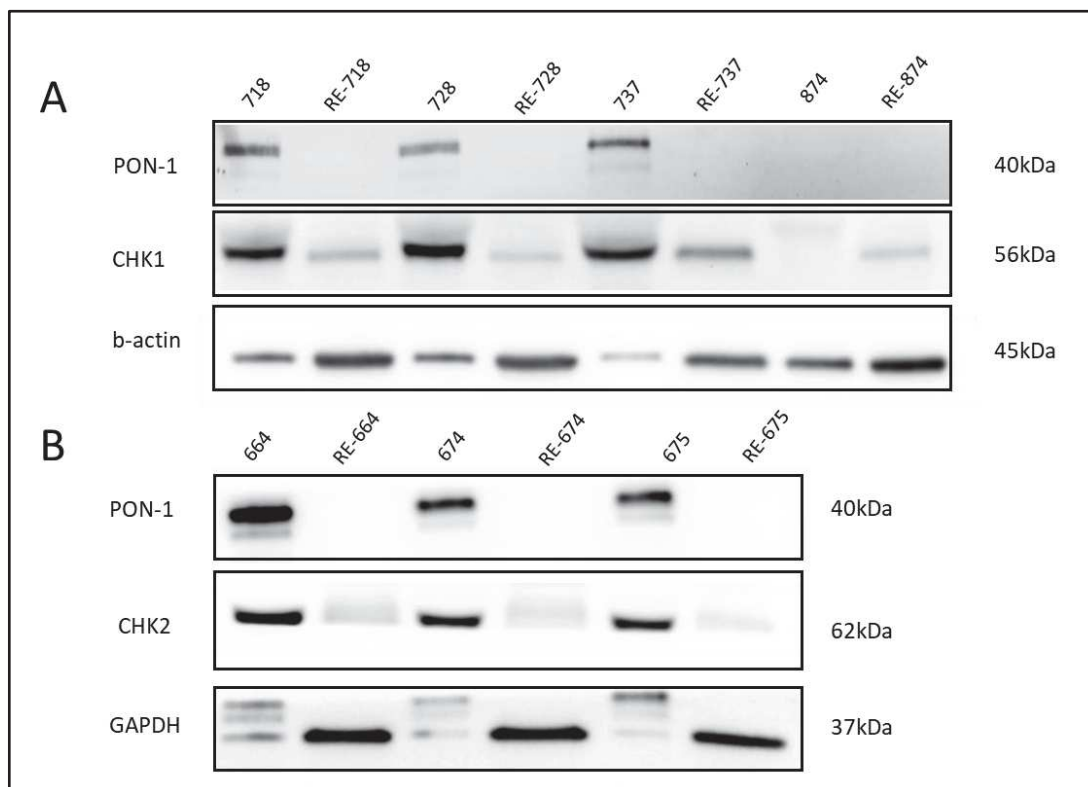


Figure 22 : Expression de PON1 dans les lymphocytes T de patients

Analyse en WB sur des extraits protéiques totaux issus de lymphocytes T humains non irradiés. Les numéros des échantillons correspondent au numéro d'inclusion des patients dans l'étude BIORISE. Les numéros en RE- correspondent aux nouveaux prélèvements des mêmes patients, réalisés à distance de leur traitement de radiothérapie, lors d'une visite de suivi à l'hôpital. A. Expression de PON1 et Chk1. B. Expression de PON1 et Chk2

Chez tous les patients que nous avons reprélevé, l'expression de PON1 a disparu entre le prélèvement initial et le reprélèvement. Chez les patients initialement négatifs pour PON1, PON1 restait négatif (patient 874 sur la figure ci-dessus). Comme précédemment, l'expression de Chk1 reste corrélée à celle de PON1 et la disparition de PON1 est associée à une nette diminution de celle de Chk1 (Figure 22 A). De façon intéressante, sur cette analyse, Chk2 est également corrélé à la présence de PON1 et la disparition de PON1 au reprélèvement des patients est associé à une diminution de l'expression de Chk2 (Figure 22 B).

Cette observation semble donc en faveur d'une expression transitoire de PON1 dans les lymphocytes de patient. Il faut garder à l'esprit que, lors du premier prélèvement, les patients étaient en prise en charge initiale de leur cancer, avec le plus souvent une chirurgie, voire une chimiothérapie récente (le

prélèvement initial étant réalisé avant la radiothérapie adjuvante). Lors du reprélèvement, ils pouvaient avoir eu divers traitements ou évènement intercurrents (hormonothérapie ou autres, sans lien avec leur maladie), et se trouvaient, le plus souvent en phase de rémission. Il existe donc de nombreux facteurs généraux pouvant modifier les lymphocytes des patients entre les deux prélèvements.

Bien que ce résultat soit étonnant et inexpliqué pour PON1, dans la littérature, l'expression cellulaire de Chk1 apparaît comme pouvant être instable au cours du temps. Dans les lymphocytes B, le niveau d'expression de Chk1 est corrélé au stade de différenciation lymphocytaire (Schuler et al., 2017). Bien que ces observations n'aient pas été faites dans les lymphocytes T, l'implication de Chk1 dans la réponse à l'irradiation dans ces derniers semble corrélée à leur stimulation. En effet, Chk1 semble protéger les lymphocytes T quiescents de l'irradiation, mais pas ceux stimulés par l'association d'un anti-CD3 et d'un anti-CD28 (et donc en prolifération) (Heylmann et al., 2018). De nombreux arguments tendent donc à suggérer une différence d'expression et d'implication de Chk1 en fonction de l'état de différenciation et d'activation des lymphocytes. Il est donc possible que ce même raisonnement soit applicable à PON1 et que son expression dépende de l'état de différenciation ou d'activation des lymphocytes.

3.4.2 Activation des lymphocytes et induction de l'expression de PON1

Ne disposant plus de cellules fraîches liées au premier prélèvement des patients de BIORISE (ceux-ci remontant à plusieurs années), nous n'avons pas pu évaluer l'activation des lymphocytes T au moment du prélèvement et de leur expression de PON1. Malgré les reprélèvements récents, sur tous les patients reprélevés à ce jour, aucun n'exprime PON1 et nous n'avons donc pas encore pu tester cette hypothèse directement sur les patients de BIORISE.

Afin de tester si l'expression de PON1 est bien liée à l'activation des lymphocytes, nous avons donc cherché à activer des lymphocytes de patients *in vitro*. Pour cela, nous avons purifiés les PBMC et les lymphocytes T issus de poches contenant une couche leuco-plaquettaire- récupérées auprès de l'EFS. Une fois mises en culture, les cellules ont été activées par l'addition d'un anticorps anti-CD3 et anti-CD28 pendant 3 à 4 jours. L'état d'activation des cellules a été confirmée par analyse du cycle cellulaire (Figure 23).

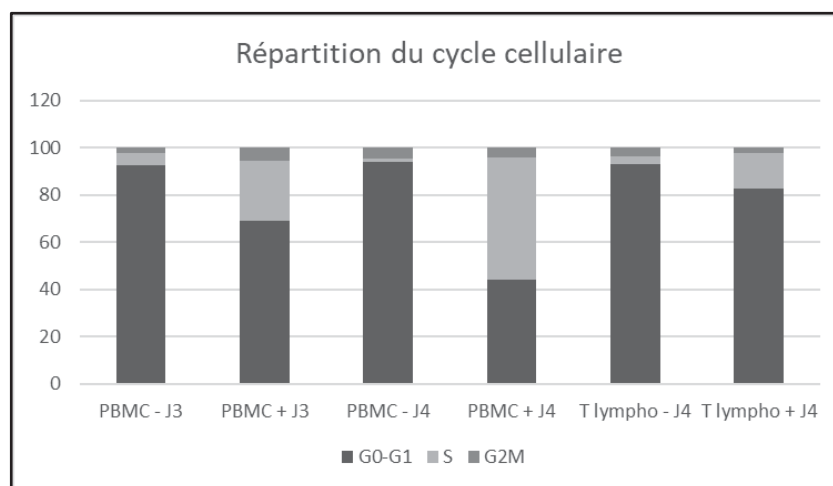


Figure 23 : Analyse du cycle cellulaire des PBMC et des lymphocytes T activés

PBMC : Peripheral Blood Mononucleated Cells. T lympho : lymphocytes T. PBMC - : contrôle négatif
 PBMC + : cellules activées par l'addition d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 au milieu de culture. J :
 nombre de jours d'incubation (3 ou 4). Les différentes phases du cycle sont représentées en proportion
 sur l'ensemble de la population cellulaire

Dans les PBMC comme dans les lymphocytes T, le traitement par CD3 et CD28 permet une augmentation du taux de cellules en phase S. Cela montre une réactivation des lymphocytes quiescent, mises en évidence par une augmentation de la réplication.

Une fois les lymphocytes ou les PBMC activés, nous avons réalisés des extraits protéiques totaux sur les cultures cellulaires. Malheureusement, l'analyse par WB de ces extraits n'a pas permis de mettre en évidence l'expression de PON1 ou de Chk1, que cela soit sur les cellules quiescentes ou activées (données non présentées ici).

Contrairement à ce qui est observé sur les lymphocytes B, il n'est donc pas certain que l'activation des lymphocytes T permette d'induire l'expression de Chk1. Cependant, nous n'avons pas non plus observé d'expression de Chk1 sur les PBMC activées (contenant des lymphocytes B). Nous n'avons donc pas réussi à reproduire les résultats attendus par la littérature. Ces expérimentations étaient très préliminaires et nécessitent confirmation. De ce fait, il nous est pour l'instant difficile de conclure quant à la corrélation entre l'état d'activation des lymphocytes et l'expression de PON1.

3.5 Conclusion des résultats de cette partie

L'expression de PON1 par les lymphocytes T de patients semble être un état transitoire et non une propriété constitutionnelle de certains patients. Cependant, nous n'avons pour l'instant pas réussi à identifier les conditions qui activent cette expression dans les lymphocytes. De façon intéressante, l'expression de PON1 semble également associée à celle de Chk1 et Chk2 dans les lymphocytes, ce qui semble associer cette protéine à des mécanismes de réparation de l'ADN en réponse à l'irradiation. Etant donné que PON1 a un rôle anti-oxydant dans le plasma et que la majorité des dommages intra-cellulaires liés à l'irradiation sont médiés par le stress oxydatif (et les ROS), cette association entre PON1 et la réparation de l'ADN semble plausible. Nous avons cherché à analyser le stress oxydatif dans nos modèles de lignées cellulaires après expression de PON1, mais l'induction de PON1 ne semblait pas engendrer de différence significative (Figure 13). Faute de matériel frais de patients exprimant PON1, nous n'avons pour l'instant pas pu analyser le stress oxydatif après irradiation dans les lymphocytes de patient.

La voie de signalisation dans laquelle PON1 interagit n'a par contre pas encore été complètement identifiée. En effet, bien que son expression semble être corrélée à celle de Chk1 et Chk2, il n'a pas été observé de modification d'autres protéines impliquées dans les voies de signalisation concernées (RPA, ATR ou γ H2AX, ATM) ou dans les voies de signalisation de l'apoptose (PARP et son clivage).

Conclusion et perspectives

La personnalisation des traitements en oncologie et en radiothérapie prend une place de plus en plus prépondérante dans la prise en charge des patients. Même en respectant les contraintes de dose, du fait d'une importante variabilité individuelle, 5 à 10% des patients vont développer des toxicités graves après la radiothérapie. Etant donné l'impact important de ces toxicités tardives sur la qualité de vie, au cours des dernières décennies, un grand nombre de tests visant à prédire le risque de toxicité radio-induites a été développé. L'usage de ces tests n'est pas encore passé dans le domaine de la routine clinique, mais le test RILA bénéficie d'un fort niveau de preuve et permet d'identifier les patients à risque de toxicités sévères après la radiothérapie.

Nous avons montré qu'un facteur sécrété par les lymphocytes T humain pouvait influencer le résultat du test RILA. Parmi les différents facteurs exprimés par les lymphocytes T, nous avons mis en évidence l'expression et la sécrétion de la paraoxonase 1, dont la présence semble corrélée au taux de RILA. Cette protéine, sécrétée en majorité par le foie et les reins, présente dans le plasma et impliquée dans la réponse au stress oxydatif, semble même surexprimée après irradiation des lymphocytes T.

Une grande partie de ce travail de thèse a été de mettre au point un modèle cellulaire *in vitro* permettant de reproduire le test RILA afin de pouvoir en explorer les différents paramètres et d'établir l'implication directe de PON1 dans son mécanisme. Malheureusement, il nous est apparu que les lymphocytes sains présentent un certain nombre de caractéristiques propres (telles que la quiescence par exemple), qui ne peuvent être reproduites dans des lignées cellulaires immortalisées. De ce fait, il semble que le meilleur modèle d'étude des lymphocytes sains reste les prélèvements directement réalisés sur les patients, malgré la lourdeur de la procédure et les limitations techniques qui en découlent.

En nous focalisant sur les cellules directement issues des patients, nous avons pu mettre en évidence que l'expression de PON1 par les lymphocytes T n'est pas corrélée à sa présence ou à sa concentration dans le plasma, qui est relativement constante d'un patient à l'autre. Bien que PON1 semble plus fréquemment exprimé chez les patients présentant un taux de RILA faible ou intermédiaire, sa concentration dans le surnageant lymphocytaire n'est par contre pas non plus corrélée au taux de RILA.

Bien que l'activité plasmatique de PON1 soit altérée dans de nombreux cancers, le rôle intracellulaire de PON1 n'est pas décrit dans la littérature et reste à ce jour méconnu (Arenas et al., 2018). Pourtant, sa surexpression dans les cellules tumorales semble avoir un rôle anti-apoptotique en réponse à de

nombreuses drogues de chimiothérapie telles que le cisplatine ou l'étoposide (Aldonza et al., 2017). Dans ce modèle tumoral, la surexpression de PON1 permet de diminuer le stress oxydant et la production de ROS. Bien que nous n'ayons pas réussi à valider cette observation dans notre lignée cellulaire *in vitro* (Figure R91), il semble logique de penser que PON1 puisse être impliquée dans les voies de réponse à l'irradiation, dont les effets sont en grande partie médiés par les ROS, dans les cellules tumorales comme dans les tissus sains. Cette hypothèse semble d'autant plus licite que la surexpression de PON2, une autre paraoxonase, exprimée de façon ubiquitaire, protège contre la mort radio-induite des cellules cancéreuses par diminution de la production de ROS (Krüger et al., 2015).

Malheureusement, ne disposant plus de lymphocytes T humains frais exprimant PON1, nous n'avons pas pu tester son impact dans la production de ROS après irradiation. En effet, la connaissance du statut PON1 des patients (basée sur l'expression ou non de PON1 par leurs lymphocytes T) est obtenue de façon tardive (1 à 2 semaines après la mise en culture des cellules). Une fois ce statut obtenu, les cellules issues du premier prélèvement ne sont plus viables et ne permettent pas une nouvelle expérimentation. Ne pouvant pas faire revenir les patients immédiatement, pour des raisons éthiques, nous avons été obligés d'attendre que les patients reviennent sur l'hôpital pour des raisons médicales.

Malheureusement, lorsque les patients connus comme exprimant PON1 dans leurs lymphocytes T sont revenus, nous avons constaté que, sur les nouveaux prélèvements, leurs lymphocytes n'exprimaient plus PON1 (Figure R17). Bien que cette observation nous ait initialement étonnés, dans la littérature, il est décrit que la concentration de PON1 dans le plasma et son activité peuvent être modulées par un certain nombre de facteurs influant sur le niveau de stress génotoxique, pouvant être extrinsèques tels que des médicaments (hypolipémiant ou anti-diabétiques oraux) ou des facteurs alimentaires (anti-oxydants et polyphénols, consommation régulière d'alcool) (Camps et al., 2009; Costa et al., 2011). Dans le cadre du cancer, l'activité plasmatique de PON1, mais pas sa concentration, est un facteur pronostique de récurrence et de survie (Bobin-Dubigeon et al., 2012). Bien qu'il n'ait jamais été décrit que les chimiothérapies ou les traitements chirurgicaux modulaient la concentration et l'activité de PON1 au niveau plasmatique, il est donc possible que des facteurs exogènes influencent l'expression de PON1, au niveau du foie (source principale du PON1 présent dans le plasma), mais également des lymphocytes T. De même, il est possible de moduler la radiosensibilité des tissus sains des patients par des facteurs extérieurs. Par exemple, l'amifostine est un radioprotecteur des tissus sains dont le métabolite, le WR-1065, élimine les ROS et prévient les dommages radio-induits dans les cellules saines (Kouvaris et al., 2007). Bien que ce médicament ne soit pas autorisé en France, il est utilisé aux Etats-Unis pour prévenir les toxicités radio-induites.

A la vue de toutes ces observations, il est possible que l'expression de PON1 dans les lymphocytes T soit en fait secondaire à un facteur exogène qui conditionnerait la radiosensibilité des patients et leur taux de RILA. En effet, nous n'avons pour l'instant pas retesté le RILA des patients reprélevés. Il serait intéressant de voir si les patients perdant l'expression de PON1 entre les 2 prélèvements voient leur taux de RILA se modifier. Etant donné le caractère transitoire de l'expression de PON1 par les lymphocytes T de nos patients, nous sommes actuellement en train de reprendre les données cliniques des patients qui exprimaient PON1 lors du premier prélèvement à la recherche d'un facteur exogène commun (traitement médical, antécédent médical, ...) qui pourrait être corrélé à l'expression de PON1. Nous avons également prévu de retester d'autres patients exprimant initialement PON1, pour l'expression de PON1 mais également pour leur taux de RILA. Ceci est malgré tout conditionné par le retour des patients en consultation, et le rythme de ces prélèvements est faible.

Ne pouvant pas établir l'effet direct de la présence de PON1 dans les lymphocytes sur la réponse à l'irradiation, faute de prélèvements adéquats, nous avons cherché à observer de façon indirecte les voies de signalisation dans lesquelles PON1 pouvait être impliquée. En nous intéressant aux voies de réparation de l'ADN impliquées après irradiation, nous avons donc pu mettre en évidence une corrélation entre l'expression de PON1 et celle de Chk1 et de Chk2 dans les lymphocytes T. Par contre, l'expression de PON1 se semble pas corrélée à celles d'autres protéines impliquées dans les voies d'apoptose, telles que PARP. Chk1 est impliquée dans la réparation des cassures simple brin (SSB), lésions survenant fréquemment après irradiation (1000 SSB par cellule pour 1 Gy), et Chk2 dans celle des cassures double brin (DSB), lésions plus rares (40 pour 1 Gy), mais plus souvent létales (Figure 24).

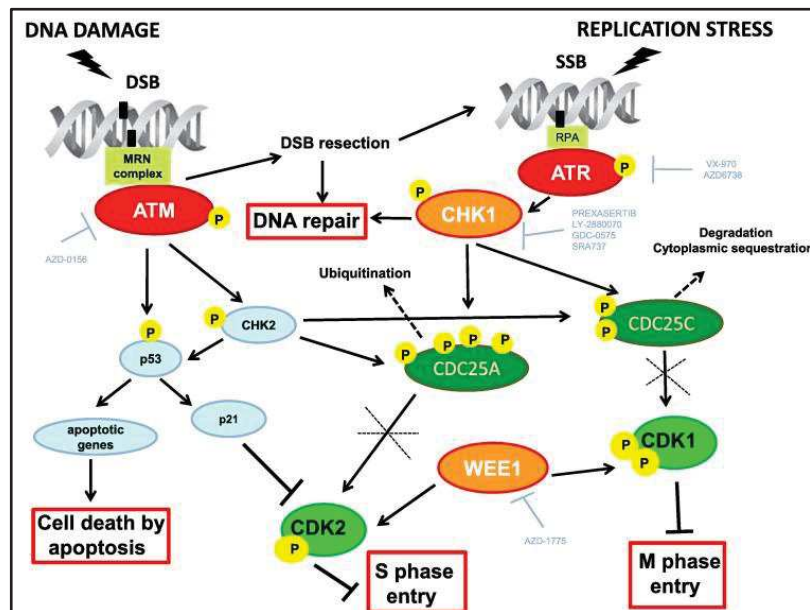


Figure 24 : Voies de signalisations et réparation de l'ADN après irradiation : implication de Chk1 et Chk2. Reproduit à partir de Carrassa et al. (Carrassa and Damia, 2017)

La corrélation entre PON1 et Chk1 et Chk2 semble donc orienter vers un rôle de PON1 dans les voies de réparation de l'ADN après irradiation. Cependant, l'absence de corrélation avec H2AX (également impliqué dans la détection des DSB) ou ATR (impliqué dans la détection des SSB) rend pour l'instant impossible de positionner PON1 dans cette cascade de signalisation. D'autre part, il serait intéressant de voir si l'induction de Chk1 ou Chk2 induit une expression de PON1 dans les lymphocytes.

L'expression de Chk1 étant corrélée à l'état d'activation des lymphocytes B (Schuler et al., 2017), nous avons essayé de voir si l'activation des PBMC induisait l'expression de PON1. Nos premières expérimentations n'ont pas montré cet effet, ni sur PON1, ni, plus curieusement, sur Chk1. Cependant, il s'agit pour l'instant de tests relativement préliminaires, et nous sommes en train de remettre au point les conditions expérimentales afin de réussir à stimuler l'expression de Chk1. Une fois ces conditions obtenues, il sera intéressant de voir si l'expression de PON1 est également régulée par l'état d'activation lymphocytaire.

Cette hypothèse pourrait être une autre explication à l'expression transitoire de PON1 dans les lymphocytes de nos patients. En effet, l'activation des lymphocytes peut être transitoire, en réponse à un stress extérieur (chirurgie ou infection). Il sera intéressant de voir si les patients qui exprimaient initialement PON1 avaient un de ces événements en commun.

Enfin, une des méthodes qui permettrait de déterminer de façon directe le rôle de PON1 dans la réponse à l'irradiation et son implication dans les résultats du RILA serait d'utiliser un modèle murin transgénique. En effet, il existe un modèle de souris PON1 KO, développé par Shih et al (Shih et al., 1998) et commercialisé par The Jackson Laboratory (B6.129X1-Pon1tm1Lus/J). Ces souris déficientes pour PON1 sont plus susceptibles aux maladies cardiovasculaires. Cependant, l'incidence des tumeurs sur la radiosensibilité n'a jamais été décrite dans ce modèle murin. En raison de limitations techniques liées à des travaux de notre animalerie, nous n'avons pas encore pu nous procurer ce modèle. Il serait intéressant de voir, une fois le protocole adapté au modèle murin, si le taux de RILA de ces souris est différent de la souche sauvage. Il est peu probable que la délétion homozygote de PON1 soit responsable d'une absence complète de l'expression de Chk1 et Chk2 au niveau de l'organisme car la délétion constitutive de Chk1 n'est pas viable au niveau embryonnaire (Zaugg et al., 2007). Il serait cependant intéressant de voir si ces souris expriment Chk1 et Chk2 dans leurs lymphocytes, et l'expression des autres protéines impliquées dans ces voies de signalisation, en l'absence totale de PON1. De façon similaire, il serait intéressant de développer un modèle de souris surexprimant PON1, afin de voir si ces souris ont une réponse différente à l'irradiation.

Au total, la protéine PON1 semble impliquée dans la réponse à l'irradiation des lymphocytes et son expression pourrait conditionner la radiosensibilité des patients. Malgré de nombreux points restant à éclaircir, l'expression de PON1 pourrait être un nouveau biomarqueur de radiosensibilité. Il est cependant essentiel de comprendre les facteurs exogènes qui pourraient influencer son expression, ainsi que les résultats du test RILA, afin d'identifier au mieux les patients à risque de toxicité après radiothérapie.

Références bibliographiques

- Abraham, P., and Sugumar, E. (2008). Enhanced PON1 activity in the kidneys of cyclophosphamide treated rats may play a protective role as an antioxidant against cyclophosphamide induced oxidative stress. *Arch. Toxicol.* **82**, 237–238.
- Aldonza, M.B.D., Son, Y.S., Sung, H.-J., Ahn, J.M., Choi, Y.-J., Kim, Y.-I., Cho, S., and Cho, J.-Y. (2017). Paraoxonase-1 (PON1) induces metastatic potential and apoptosis escape via its antioxidative function in lung cancer cells. *Oncotarget* **8**, 42817–42835.
- Aldridge, W.N. (1953). Serum esterases. II. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. *Biochem. J.* **53**, 117–124.
- Altenhöfer, S., Witte, I., Teiber, J.F., Wilgenbus, P., Pautz, A., Li, H., Daiber, A., Witan, H., Clement, A.M., Förstermann, U., et al. (2010). One Enzyme, Two Functions PON2 PREVENTS MITOCHONDRIAL SUPEROXIDE FORMATION AND APOPTOSIS INDEPENDENT FROM ITS LACTONASE ACTIVITY. *J. Biol. Chem.* **285**, 24398–24403.
- Andreassen, C.N., Alsner, J., and Overgaard, J. (2002). Does variability in normal tissue reactions after radiotherapy have a genetic basis – where and how to look for it? *Radiother. Oncol.* **64**, 131–140.
- Ansari, A.M., Ahmed, A.K., Matsangos, A.E., Lay, F., Born, L.J., Marti, G., Harmon, J.W., and Sun, Z. (2016). Cellular GFP Toxicity and Immunogenicity: Potential Confounders in in Vivo Cell Tracking Experiments. *Stem Cell Rev. Rep.* **12**, 553–559.
- Arenas, M., Rodríguez, E., Sahebkar, A., Sabater, S., Rizo, D., Pallisé, O., Hernández, M., Riu, F., Camps, J., and Joven, J. (2018). Paraoxonase-1 activity in patients with cancer: A systematic review and meta-analysis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **127**, 6–14.
- Ayub Aamir, Mackness Michael I., Arrol Sharon, Mackness Bharti, Patel Jeetesh, and Durrington Paul N. (1999). Serum Paraoxonase After Myocardial Infarction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 330–335.
- Azria, D., Riou, O., Castan, F., Nguyen, T.D., Peignaux, K., Lemanski, C., Lagrange, J.-L., Kirova, Y., Lartigau, E., Belkacemi, Y., et al. (2015). Radiation-induced CD8 T-lymphocyte Apoptosis as a Predictor of Breast Fibrosis After Radiotherapy: Results of the Prospective Multicenter French Trial. *EBioMedicine* **2**, 1965–1973.
- Barnett, G.C., West, C.M.L., Dunning, A.M., Elliott, R.M., Coles, C.E., Pharoah, P.D.P., and Burnet, N.G. (2009). Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 134.
- Baskol, G., Demir, H., Baskol, M., Kilic, E., Ates, F., Kocer, D., and Muhtaroglu, S. (2005). Assessment of paraoxonase 1 activity and malondialdehyde levels in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Biochem.* **38**, 951–955.
- Bentzen, S.M., and Overgaard, M. (1991). Relationship between early and late normal-tissue injury after postmastectomy radiotherapy. *Radiother. Oncol.* **20**, 159–165.

- Bentzen, S.M., Constine, L.S., Deasy, J.O., Eisbruch, A., Jackson, A., Marks, L.B., Haken, R.K.T., and Yorke, E.D. (2010). Quantitative Analyses of Normal Tissue Effects in the Clinic (QUANTEC): An Introduction to the Scientific Issues. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **76**, S3–S9.
- Bobin-Dubigeon, C., Jaffré, I., Joalland, M.-P., Classe, J.-M., Campone, M., Hervé, M., and Bard, J.-M. (2012). Paraoxonase 1 (PON1) as a marker of short term death in breast cancer recurrence. *Clin. Biochem.* **45**, 1503–1505.
- Brophy, V.H., Jarvik, G.P., and Furlong, C.E. (2002). PON1 Polymorphisms. In *Paraoxonase (PON1) in Health and Disease: Basic and Clinical Aspects*, L.G. Costa, and C.E. Furlong, eds. (Boston, MA: Springer US), pp. 53–77.
- Camps, J., Marsillach, J., and Joven, J. (2009). Pharmacological and lifestyle factors modulating serum paraoxonase-1 activity. *Mini Rev. Med. Chem.* **9**, 911–920.
- Cao, H., Girard-Globa, A., Berthezene, F., and Moulin, P. (1999). Paraoxonase protection of LDL against peroxidation is independent of its esterase activity towards paraoxon and is unaffected by the Q→R genetic polymorphism. *J. Lipid Res.* **40**, 133–139.
- Carrassa, L., and Damia, G. (2017). DNA damage response inhibitors: Mechanisms and potential applications in cancer therapy. *Cancer Treat. Rev.* **60**, 139–151.
- Chistiakov, D.A., Melnichenko, A.A., Orekhov, A.N., and Bobryshev, Y.V. (2017). Paraoxonase and atherosclerosis-related cardiovascular diseases. *Biochimie* **132**, 19–27.
- Costa, L.G., Giordano, G., and Furlong, C.E. (2011). Pharmacological and dietary modulators of paraoxonase 1 (PON1) activity and expression: the hunt goes on. *Biochem. Pharmacol.* **81**, 337–344.
- Deakin, S., Leviev, I., Guernier, S., and James, R.W. (2003). Simvastatin Modulates Expression of the PON1 Gene and Increases Serum Paraoxonase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 2083–2089.
- Delaney, G., Jacob, S., Featherstone, C., and Barton, M. (2005). The role of radiotherapy in cancer treatment. *Cancer* **104**, 1129–1137.
- Despeignes, V. (1896). Observation concernant un cas de cancer de l'estomac traite par les rayons Rontgen. *Lyon Méd* **82**, 428–430.
- Draganov, D.I., Stetson, P.L., Watson, C.E., Billecke, S.S., and Du, B.N.L. (2000). Rabbit Serum Paraoxonase 3 (PON3) Is a High Density Lipoprotein-associated Lactonase and Protects Low Density Lipoprotein against Oxidation. *J. Biol. Chem.* **275**, 33435–33442.
- Draganov, D.I., Teiber, J.F., Speelman, A., Osawa, Y., Sunahara, R., and Du, B.N.L. (2005). Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J. Lipid Res.* **46**, 1239–1247.
- Durmaz, T., Keles, T., Ayhan, H., Cay, N., Bayram, N.A., Bilen, E., Akcay, M., Erdogan, K.E., Erel, O., and Bozkurt, E. (2014). Diminished serum paraoxonase activity in patients with coronary artery calcification. *Kardiol. Pol.* **72**, 831–838.
- Emami, B., Lyman, J., Brown, A., Cola, L., Goitein, M., Munzenrider, J.E., Shank, B., Solin, L.J., and Wesson, M. (1991). Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol.* **21**, 109–122.

- Eschrich, S.A., Pramana, J., Zhang, H., Zhao, H., Boulware, D., Lee, J.-H., Bloom, G., Rocha-Lima, C., Kelley, S., Calvin, D.P., et al. (2009). A Gene Expression Model of Intrinsic Tumor Radiosensitivity: Prediction of Response and Prognosis After Chemoradiation. *Int. J. Radiat. Oncol.* 75, 489–496.
- Ferré, N., Camps, J., Prats, E., Vilella, E., Paul, A., Figuera, L., and Joven, J. (2002). Serum paraoxonase activity: a new additional test for the improved evaluation of chronic liver damage. *Clin. Chem.* 48, 261–268.
- Fridman, O., Gariglio, L., Riviere, S., Porcile, R., Fuchs, A., and Potenzoni, M. (2016). Paraoxonase 1 gene polymorphisms and enzyme activities in coronary artery disease and its relationship to serum lipids and glycemia. *Arch. Cardiol. Mex.* 86, 350–357.
- Furlong, C.E., Marsillach, J., Jarvik, G.P., and Costa, L.G. (2016). Paraoxonases-1, -2 and -3: What are their functions? *Chem. Biol. Interact.* 259, Part B, 51–62.
- Gioia, L., Siddique, A., Head, S.R., Salomon, D.R., and Su, A.I. (2018). A genome-wide survey of mutations in the Jurkat cell line. *BMC Genomics* 19.
- Hall, W.A., Bergom, C., Thompson, R.F., Baschnagel, A.M., Vijayakumar, S., Willers, H., Li, X.A., Schultz, C.J., Wilson, G.D., West, C.M.L., et al. (2018). Precision Oncology and Genomically Guided Radiation Therapy: A Report From the American Society for Radiation Oncology/American Association of Physicists in Medicine/National Cancer Institute Precision Medicine Conference. *Int. J. Radiat. Oncol.* 101, 274–284.
- Haraguchi, Y., Toh, R., Hasokawa, M., Nakajima, H., Honjo, T., Otsui, K., Mori, K., Miyamoto-Sasaki, M., Shinohara, M., Nishimura, K., et al. (2014). Serum myeloperoxidase/paraoxonase 1 ratio as potential indicator of dysfunctional high-density lipoprotein and risk stratification in coronary artery disease. *Atherosclerosis* 234, 288–294.
- Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R.B.G., McCarthy, A., Toker, L., et al. (2004). Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 412–419.
- Hassett, C., Richter, R.J., Humbert, R., Chapline, C., Crabb, J.W., Omiecinski, C.J., and Furlong, C.E. (1991). Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence. *Biochemistry* 30, 10141–10149.
- Heylmann, D., Badura, J., Becker, H., Fahrner, J., and Kaina, B. (2018). Sensitivity of CD3/CD28-stimulated versus non-stimulated lymphocytes to ionizing radiation and genotoxic anticancer drugs: key role of ATM in the differential radiation response. *Cell Death Dis.* 9.
- Holthusen, H. (1936). Erfahrungen über die Verträglichkeitsgrenze für Röntgenstrahlen und deren Nutzenanwendung zur Verhütung von Schäden. *Strahlentherapie* 57, 254–269.
- Humbert, R., Adler, D.A., Disteche, C.M., Hassett, C., Omiecinski, C.J., and Furlong, C.E. (1993). The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat. Genet.* 3, 73–76.
- Jaichander, P., Selvarajan, K., Garelnabi, M., and Parthasarathy, S. (2008). Induction of paraoxonase 1 and apolipoprotein A-I gene expression by aspirin. *J. Lipid Res.* 49, 2142–2148.
- Januszek, R. (2016). Paraoxonase-1 and Simvastatin Treatment in Patients with Stable Coronary Artery Disease. *Int. J. Vasc. Med.* 2016.

- Khersonsky, O., and Tawfik, D.S. (2005). Structure–Reactivity Studies of Serum Paraoxonase PON1 Suggest that Its Native Activity Is Lactonase. *Biochemistry* 44, 6371–6382.
- Khersonsky, O., and Tawfik, D.S. (2006). Chromogenic and Fluorogenic Assays for the Lactonase Activity of Serum Paraoxonases. *ChemBioChem* 7, 49–53.
- Kiranoglu, S., Sinan, S., Gencer, N., Köckar, F., and Arslan, O. (2007). In vivo effects of oral contraceptives on paraoxonase, catalase and carbonic anhydrase enzyme activities on mouse. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 1048–1051.
- Kouvaris, J.R., Kouloulis, V.E., and Vlahos, L.J. (2007). Amifostine: the first selective-target and broad-spectrum radioprotector. *The Oncologist* 12, 738–747.
- Krüger, M., Pabst, A.M., Al-Nawas, B., Horke, S., and Moergel, M. (2015). Paraoxonase-2 (PON2) protects oral squamous cell cancer cells against irradiation-induced apoptosis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 141, 1757–1766.
- Krüger, M., Amort, J., Wilgenbus, P., Helmstädter, J.P., Grechowa, I., Ebert, J., Tenzer, S., Moergel, M., Witte, I., and Horke, S. (2016). The anti-apoptotic PON2 protein is Wnt/ β -catenin-regulated and correlates with radiotherapy resistance in OSCC patients. *Oncotarget*.
- Lawlor, D.A., Day, I.N.M., Gaunt, T.R., Hinks, L.J., Timpson, N., Ebrahim, S., and Davey Smith, G. (2007). The association of the paraoxonase (PON1) Q192R polymorphism with depression in older women: findings from the British Women’s Heart and Health Study. *J. Epidemiol. Community Health* 61, 85–87.
- Levieu, I., Deakin, S., and James, R.W. (2001). Decreased stability of the M54 isoform of paraoxonase as a contributory factor to variations in human serum paraoxonase concentrations. *J. Lipid Res.* 42, 528–535.
- Levy, E., Trudel, K., Bendayan, M., Seidman, E., Delvin, E., Elchebly, M., Lavoie, J.-C., Precourt, L.-P., Amre, D., and Sinnett, D. (2007). Biological role, protein expression, subcellular localization, and oxidative stress response of paraoxonase 2 in the intestine of humans and rats. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 293, G1252–G1261.
- Mackness, M.I. (1989). Possible medical significance of human serum ‘A’-esterases. *Enzym. Hydrolysing Organophosphorus Compd. Ellis Horwood Chichester* 202–213.
- Mackness, M., and Mackness, B. (2015). HUMAN PARAOXONASE-1 (PON1): GENE STRUCTURE AND EXPRESSION, PROMISCUOUS ACTIVITIES AND MULTIPLE PHYSIOLOGICAL ROLES. *Gene* 567, 12–21.
- Mackness, B., Durrington, P.N., and Mackness, M.I. (1998a). Human Serum Paraoxonase. *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* 31, 329–336.
- Mackness, B., Mackness, M.I., Arrol, S., Turkie, W., and Durrington, P.N. (1998b). Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Lett.* 423, 57–60.
- Mackness, B., Beltran-Debon, R., Aragones, G., Joven, J., Camps, J., and Mackness, M. (2010). Human tissue distribution of paraoxonases 1 and 2 mRNA. *IUBMB Life* 62, 480–482.

Malik, U.U., Siddiqui, I.A., Hashim, Z., and Zarina, S. (2014). Measurement of serum paraoxonase activity and MDA concentrations in patients suffering with oral squamous cell carcinoma. *Clin. Chim. Acta* 430, 38–42.

Mallinckrodt, M.G., and Diepgen, T.L. (1988). The human serum paraoxonase—Polymorphism and specificity. *Toxicol. Environ. Chem.* 18, 79–196.

Marsillach, J., Martínez-Vea, A., Marcas, L., Mackness, B., Mackness, M., Ferré, N., Joven, J., and Camps, J. (2007). Administration of exogenous erythropoietin beta affects lipid peroxidation and serum paraoxonase-1 activity and concentration in predialysis patients with chronic renal disease and anaemia. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34, 347–349.

Mayer, C., Popanda, O., Greve, B., Fritz, E., Illig, T., Eckardt-Schupp, F., Gomolka, M., Benner, A., and Schmezer, P. (2011). A radiation-induced gene expression signature as a tool to predict acute radiotherapy-induced adverse side effects. *Cancer Lett.* 302, 20–28.

Mazur, A. (1946). An enzyme in animal tissues capable of hydrolysing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates. *J. Biol. Chem.* 164, 271–289.

Mota, A., Hemati-Dinarvand, M., Akbar Taheraghdam, A., Reza Nejabati, H., Ahmadi, R., Ghasemnejad, T., Hasanpour, M., and Valilo, M. (2019). Association of Paraoxonase1 (PON1) Genotypes with the Activity of PON1 in Patients with Parkinson's Disease. *Acta Neurol. Taiwanica* 28(3), 66–74.

Nakayama Junichi, Ohtsuki Masahiko, and Oda Tomiichiro (2013). Caspase-Independent Cell Death by Fas Ligation in Human Thymus-Derived T Cell Line, HPB-ALL Cells. *Microbiol. Immunol.* 51, 1029–1037.

Ng, C.J., Wadleigh, D.J., Gangopadhyay, A., Hama, S., Grijalva, V.R., Navab, M., Fogelman, A.M., and Reddy, S.T. (2001). Paraoxonase-2 Is a Ubiquitously Expressed Protein with Antioxidant Properties and Is Capable of Preventing Cell-mediated Oxidative Modification of Low Density Lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 276, 44444–44449.

Ng, C.J., Bourquard, N., Grijalva, V., Hama, S., Shih, D.M., Navab, M., Fogelman, A.M., Lusis, A.J., Young, S., and Reddy, S.T. (2006). Paraoxonase-2 Deficiency Aggravates Atherosclerosis in Mice Despite Lower Apolipoprotein-B-containing Lipoproteins ANTI-ATHEROGENIC ROLE FOR PARAOXONASE-2. *J. Biol. Chem.* 281, 29491–29500.

Oda, M.N., Bielicki, J.K., Ho, T.T., Berger, T., Rubin, E.M., and Forte, T.M. (2002). Paraoxonase 1 overexpression in mice and its effect on high-density lipoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 921–927.

Ozsahin, M., Ozsahin, H., Shi, Y., Larsson, B., Würigler, F.E., and Crompton, N.E. (1997). Rapid assay of intrinsic radiosensitivity based on apoptosis in human CD4 and CD8 T-lymphocytes. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 38, 429–440.

Pan, X., Huang, L., Li, M., Mo, D., Liang, Y., Liu, Z., Huang, Z., Huang, L., Liu, J., and Zhu, B. (2019). The Association between PON1 (Q192R and L55M) Gene Polymorphisms and Risk of Cancer: A Meta-Analysis Based on 43 Studies. *BioMed Res. Int.* 2019.

Précourt, L.-P., Amre, D., Denis, M.-C., Lavoie, J.-C., Delvin, E., Seidman, E., and Levy, E. (2011). The three-gene paraoxonase family: Physiologic roles, actions and regulation. *Atherosclerosis* 214, 20–36.

- Primo-Parmo, S.L., Sorenson, R.C., Teiber, J., and Du, B.N.L. (1996). The Human Serum Paraoxonase/Arylesterase Gene (PON1) Is One Member of a Multigene Family. *Genomics* 33, 498–507.
- Richter, R.J., and Furlong, C.E. (1999). Determination of paraoxonase (PON1) status requires more than genotyping. *Pharmacogenetics* 9, 745–753.
- Richter, R.J., Jarvik, G.P., and Furlong, C.E. (2008). Determination of Paraoxonase 1 Status Without the Use of Toxic Organophosphate Substrates. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 1, 147–152.
- Richter, R.J., Jarvik, G.P., and Furlong, C.E. (2009). Paraoxonase 1 (PON1) status and substrate hydrolysis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 235, 1–9.
- Rosenblat, M., Coleman, R., Reddy, S.T., and Aviram, M. (2009). Paraoxonase 2 attenuates macrophage triglyceride accumulation via inhibition of diacylglycerol acyltransferase 1. *J. Lipid Res.* 50, 870–879.
- Sabesin, S.M., Hawkins, H.L., Kuiken, L., and Ragland, J.B. (1977). Abnormal plasma lipoproteins and lecithin-cholesterol acyltransferase deficiency in alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 72, 510–518.
- Schuler, F., Weiss, J.G., Lindner, S.E., Lohmüller, M., Herzog, S., Spiegl, S.F., Menke, P., Geley, S., Labi, V., and Villunger, A. (2017). Checkpoint kinase 1 is essential for normal B cell development and lymphomagenesis. *Nat. Commun.* 8.
- Schweikert, E.-M., Devarajan, A., Witte, I., Wilgenbus, P., Amort, J., Förstermann, U., Shabazian, A., Grijalva, V., Shih, D.M., Farias-Eisner, R., et al. (2012). PON3 is upregulated in cancer tissues and protects against mitochondrial superoxide-mediated cell death. *Cell Death Differ.* 19, 1549–1560.
- Sentí Mariano, Tomás Marta, Marrugat Jaume, and Elosua Roberto (2001). Paraoxonase1-192 Polymorphism Modulates the Nonfatal Myocardial Infarction Risk Associated With Decreased HDLs. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 415–420.
- Serrato, M., and Marian, A.J. (1995). A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J. Clin. Invest.* 96, 3005–3008.
- Shen, Y., Ding, F.H., Sun, J.T., Pu, L.J., Zhang, R.Y., Zhang, Q., Chen, Q.J., Shen, W.F., and Lu, L. (2015). Association of elevated apoA-I glycation and reduced HDL-associated paraoxonase1, 3 activity, and their interaction with angiographic severity of coronary artery disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc. Diabetol.* 14, 52.
- Shih, D.M., Gu, L., Xia, Y.R., Navab, M., Li, W.F., Hama, S., Castellani, L.W., Furlong, C.E., Costa, L.G., Fogelman, A.M., et al. (1998). Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 394, 284–287.
- Shih, D.M., Xia, Y.R., Wang, X.P., Miller, E., Castellani, L.W., Subbanagounder, G., Cheroutre, H., Faull, K.F., Berliner, J.A., Witztum, J.L., et al. (2000). Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J. Biol. Chem.* 275, 17527–17535.
- Shunmoogam, N., Naidoo, P., and Chilton, R. (2018). Paraoxonase (PON)-1: a brief overview on genetics, structure, polymorphisms and clinical relevance. *Vasc. Health Risk Manag.* 14, 137–143.

- Soukharev, S., and Hammond, D.J. (2004). A fluorogenic substrate for detection of organophosphatase activity. *Anal. Biochem.* 327, 140–148.
- Stevens, V.L., Rodriguez, C., Talbot, J.T., Pavluck, A.L., Thun, M.J., and Calle, E.E. (2008). Paraoxonase 1 (PON1) polymorphisms and prostate cancer in the CPS-II Nutrition Cohort. *The Prostate* 68, 1336–1340.
- Tang W.H. Wilson, Hartiala Jaana, Fan Yiying, Wu Yuping, Stewart Alexandre F.R., Erdmann Jeanette, Kathiresan Sekar, null null, Roberts Robert, McPherson Ruth, et al. (2012). Clinical and Genetic Association of Serum Paraoxonase and Arylesterase Activities With Cardiovascular Risk. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 2803–2812.
- Taylor, A.M., Harnden, D.G., Arlett, C.F., Harcourt, S.A., Lehmann, A.R., Stevens, S., and Bridges, B.A. (1975). Ataxia telangiectasia: a human mutation with abnormal radiation sensitivity. *Nature* 258, 427–429.
- Torres-Roca, J.F., Eschrich, S., Zhao, H., Bloom, G., Sung, J., McCarthy, S., Cantor, A.B., Scuto, A., Li, C., Zhang, S., et al. (2005). Prediction of Radiation Sensitivity Using a Gene Expression Classifier. *Cancer Res.* 65, 7169–7176.
- Tresukosol, D., Suktitipat, B., Hunnangkul, S., Kamkaew, R., Poldee, S., Tassaneetrithep, B., and Likidlilid, A. (2014). Effects of cytochrome P450 2C19 and paraoxonase 1 polymorphisms on antiplatelet response to clopidogrel therapy in patients with coronary artery disease. *PloS One* 9, e110188.
- Turesson, I., Nyman, J., Holmberg, E., and Odén, A. (1996). Prognostic factors for acute and late skin reactions in radiotherapy patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 36, 1065–1075.
- Tward Aaron, Xia Yu-Rong, Wang Xu-Ping, Shi Yi-Shou, Park Christina, Castellani Lawrence W., Lusi Aldons J., and Shih Diana M. (2002). Decreased Atherosclerotic Lesion Formation in Human Serum Paraoxonase Transgenic Mice. *Circulation* 106, 484–490.
- Wang, B., Wei, J., Meng, L., Wang, H., Qu, C., Chen, X., Xin, Y., and Jiang, X. (2020). Advances in pathogenic mechanisms and management of radiation-induced fibrosis. *Biomed. Pharmacother.* 121, 109560.
- Wang, M., Lang, X., Zou, L., Huang, S., and Xu, Z. (2011). Four genetic polymorphisms of paraoxonase gene and risk of coronary heart disease: A meta-analysis based on 88 case–control studies. *Atherosclerosis* 214, 377–385.
- van Wijk, J., Coll, B., Cabezas, M.C., Koning, E., Camps, J., Mackness, B., and Joven, J. (2006). Rosiglitazone modulates fasting and post-prandial paraoxonase 1 activity in type 2 diabetic patients. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 33, 1134–1137.
- Zaugg, K., Su, Y.-W., Reilly, P.T., Moolani, Y., Cheung, C.C., Hakem, R., Hirao, A., Liu, Q., Elledge, S.J., and Mak, T.W. (2007). Cross-talk between Chk1 and Chk2 in double-mutant thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 3805–3810.

Publications annexes



T lymphocytes to predict radiation-induced late effects in normal tissues

Muriel Brengues, Ariane Lapierre, Céline Bourgier, André Pèlerin, Mahmut Özsahin & David Azria

To cite this article: Muriel Brengues, Ariane Lapierre, Céline Bourgier, André Pèlerin, Mahmut Özsahin & David Azria (2016): T lymphocytes to predict radiation-induced late effects in normal tissues, Expert Review of Molecular Diagnostics, DOI: [10.1080/14737159.2017.1271715](https://doi.org/10.1080/14737159.2017.1271715)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/14737159.2017.1271715>



Accepted author version posted online: 11 Dec 2016.
Published online: 22 Dec 2016.



[Submit your article to this journal](#)



Article views: 2



[View related articles](#)



[View Crossmark data](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=iero20>

Download by: [195.220.112.251]

Date: 22 December 2016, At: 04:22

REVIEW

T lymphocytes to predict radiation-induced late effects in normal tissues

Muriel Brengues^{a,b,d}, Ariane Lapiere^{a,b,c,d}, Céline Bourcier^{a,b,c,d}, André Pèlerin^{a,b,c,d}, Mahmut Özahin^e and David Azria^{a,b,c,d}

^aImmunotargeting and Radiobiology in Oncology, IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, Montpellier, France; ^bINSERM, U1194, Montpellier, France; ^cUniversité de Montpellier, Montpellier, France; ^dDepartment of Radiation Oncology, Institut Cancer Montpellier, Montpellier, France; ^eService de Radio-Oncologie, CHUV, Lausanne, France

ABSTRACT

Introduction: Radiotherapy is one of the main treatments for solid tumors. The total dose that can be delivered to the tumor is limited by the radiation amount received by the surrounding normal tissues, which are at risk of developing acute and late radiation-induced effects.

Areas covered: Severe late radiation-induced toxicity occurs in 5% to 10% of patients following radiotherapy. However, the current radiotherapy and radiation protection protocols do not take into account the variations in radiosensitivity among individuals. This review will focus on late radiotherapy-induced side effects and on the different cellular assays (γ -H2AX/53BP1 focus formation, G2 metaphase, G0 micronucleus formation and radio-induced apoptosis in CD8⁺ T-lymphocytes: level I evidence) that have been developed to predict their occurrence in patients.

Expert commentary: The routine prediction of late radiation-induced toxicity in normal tissues in the clinic will allow personalized radiotherapy with better outcome and less side effects. Patients at low risk of late toxicity could receive a higher total dose to the tumor. Conversely, patients at high risk of late toxicity should receive lower radiation doses per fraction, using state-of-the-art treatment techniques, or alternative therapies to avoid radiation-induced side effects.

ARTICLE HISTORY

Received 25 October 2016
Accepted 9 December 2016

KEYWORDS

Lymphocytes; apoptosis; micronuclei; phospho-H2AX; normal tissue late effects; radiotherapy; fibroblasts

1. Introduction

Fifty percent of all cancer patients benefit from receiving radiotherapy (RT) as part of their cancer management. Unlike chemotherapy, RT is a local treatment in which the maximal dose is delivered to the tumor; however, due to technical constraints, surrounding organs and tissues can also be irradiated, leading to side effects. Indeed, exposure of cells to clinically relevant doses of ionizing radiation causes significant nuclear DNA damage: 1000 single-strand breaks, 40 double-strand breaks (DSB), and 3000 damaged bases per gray (Gy) [1]. As complete DNA repair is harder to achieve, DSBs result, in most instances, in mitotic death of dividing cells (for instance, proliferating endothelial cells) or death by apoptosis (for instance, quiescent lymphocytes) [2,3]. Recent technological advances, such as *intensity-modulated radiation therapy* (IMRT), allow shaping the radiation beams to closely fit the tumor area and thus decreasing the irradiation of healthy tissues [4]. However, the current RT recommendations are protocol based and the main limitation is the dose to the organs at risk. The radiation sensitivity of these organs has been established based on population studies, without taking into account individual variations in radiation sensitivity [5]. About 5–10% of all patients undergoing RT will develop severe late side effects. Although this percentage is considered acceptable by medical standards, these patients might experience a tremendous amount of pain, leading to a significant decrease in their quality of life. Early identification of

these patients is critical, to offer them an alternative treatment to RT, if possible, or at least to reduce the radiation exposure of organs at risk (Figure 1). Conversely, patients at low risk of radiation-induced side effects could benefit of higher total radiation doses to improve tumor control. This review will focus on the cellular assays that have been developed, first using fibroblasts and then lymphocytes, to predict radiation-induced side effects. Genetic markers of late radiation-induced toxicity will not be discussed here because they have been the topic of many other reviews [6–11].

2. Late side effects in normal tissue after RT

Post-RT toxicities are subdivided in acute effects that appear during and up to few weeks following the treatment, and in late effects that occur from 3–6 months to several years after RT end. Symptoms can be moderate or severe and can worsen with time. Late radiation-induced toxicity occurs in tissues that have a slow cell turnover, such as subcutaneous tissue, fatty tissues, muscle, brain, kidney and liver, as well as in sites of slow turnover within tissues that contain rapidly proliferating cells, such as the intestine wall [12]. These late complications are pathologically diverse and include fibrosis, vascular sequelae, atrophy, and secondary effects on endocrine and growth functions [12–14]. The mechanisms underlying the appearance of these lesions are still not well characterized; however, several authors suggest that there is a correlation with the local

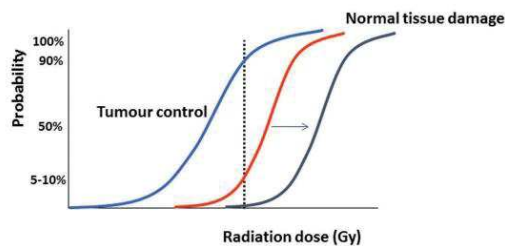


Figure 1. Normal tissue complication probability (NTCP) modeling for treatment planning. The NTCP represents the probability that a given radiation dose will cause a normal organ/tissue to experience toxicity and allows ranking treatment plans/modalities in terms of predicted late toxicities. The blue curve represents tumor control probability at any given dose. The red curve shows the NTCP. The gray curve shows the NTCP for patients at lower risk of ionizing radiation toxicities. At a dose high enough to reach tumor control, these patients have a significantly lower NTCP than patients at high risk of radiation-induced toxicities.

and permanent production of cytokines and growth factors. Furthermore, late radiation-induced lesions are characterized by the direct destruction of stem cells, vascular complications, and development of interstitial fibrosis [15].

Understanding the mechanism of radiation-induced fibrosis is one of the major research axes in the prevention of late post-RT toxicities in normal tissues. Fibrosis is a major RT consequence and corresponds to an abnormal accumulation of extracellular matrix. In some cases, it can lead to failure of the concerned organ. Fibrosis is a four-step dynamic process in response to stress: pre-fibrotic phase, established fibrosis, late fibrosis, and atrophy/necrosis [16]. In addition to activation of fibroblasts and immune cells, fibrosis-inducing events cause release of pro-fibrotic metabolites (e.g. reactive oxygen species, ROS), and secretion of chemokines and growth factors that are essential for fibrosis development [17,18]. Among these latter molecules, the cytokine transforming growth factor- β (TGF- β) plays a key role in fibrosis development and progression in almost, if not all, organs. Moreover, TGF- β and ROS-dependent signaling could potentiate each other and their targeting could be a key element in fibrosis treatment.

3. Fibroblast-based assays to predict radiation toxicity in normal tissue

The first hypothesis to explain variations in radiation sensitivity among patients was based on the observation that children with ataxia telangiectasia, a rare pediatric disease, are particularly sensitive to the effects of radiation treatments. This autosomal recessive disorder is caused by mutations in the *ATM* gene that encodes a protein involved in DNA damage repair. RT in these patients is contraindicated due to the high risk of severe side effects [19]. Several studies have tried to find a link between the *ATM* gene and late post-RT toxicity, but results were not consistent. However, more recently, *ATM* single-nucleotide polymorphisms (SNPs) have been associated with late radiation-induced toxicity [6,20–22]. In addition, upon

exposure to X-rays, fibroblasts from patients with ataxia telangiectasia show a reduced survival compared with fibroblasts from healthy patients [19]. These results were the starting point to develop assays to predict radiosensitivity using fibroblasts from patients with cancer. Clonogenic assays using fibroblasts show some inconsistencies in several studies in terms of prediction of acute and chronic effects of radiation [19,23–25]. Therefore, other methods (residual DSBs, micronuclei formation and comet assays) were developed using fibroblasts, based on the finding that irradiation-induced DNA damage leads to cell death. These tests showed promising results; however, none of them was validated in a large clinical trial [26–28]. More recently, a new assay, ATM protein based has been developed [29]. The authors showed, using skin biopsy, that radiosensitive patients present a delay in nucleoshuttling of the ATM protein in the healthy tissue response to radiation. Overall, fibroblast-based assays are difficult to transfer to the clinic due to the time needed and because the test score–radiosensitivity correlation has not been fully demonstrated in clinical trials.

4. Lymphocyte-based assays to predict late radiation-induced toxicity in normal tissue

Radiation is often viewed as an immune-suppressive agent and lymphocytes are very radiation sensitive. Local RT has a direct cytotoxic effect on the circulating immunocyte pool because blood flows through the radiation field, independently of other, more complex effects associated with immune activation in response to irradiation [30]. The extent of the immune cell depletion differs in function of the tissue, field size, delivery schedule, and radiation dose [31]. The end result is that irradiation affects the immune system balance. This may be restored with time, depending on the recovery time of the different immune subsets, but alterations may persist for long periods or even forever, as is seen in atomic bomb survivors [30]. Moreover, as the distribution of T cell subsets is organ specific, recovery proceeds at different rates in different tissues and will depend on the produced chemokines [32,33]. Lymphocyte subsets also have different radiosensitivity. Indeed, spontaneous and radiation-induced apoptosis rates are different in the three lymphocyte subpopulations ($CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes and B lymphocytes) from healthy individuals [34]. $CD4^+$ T lymphocytes are the most resistant and B lymphocytes the most sensitive to radiation. This study also showed that the spontaneous and radiation-induced apoptosis rates are correlated in all cell types, and interindividual variance is considerably higher than intraindividual variance for both apoptosis types. It is also found that the radiation-induced apoptosis rate is positively correlated with age only in $CD8^+$ cells. Conversely, other studies reported that susceptibility to radiation-induced cytotoxicity decreases with age in both $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes [35,36]. This discrepancy could be explained by the fact that in the last two studies fresh lymphocytes were used, whereas in the first one cryopreserved samples were tested.

As fibroblasts are difficult to obtain and fibroblast-based assays are time consuming and not easily transferable to the clinic, fibroblasts have been progressively replaced by

lymphocyte-based assays that use some of the techniques developed for fibroblasts. Lymphocytes are very radiosensitive, easy to obtain in large quantity and, therefore, represent an ideal material to develop new predictive assays for radiosensitivity. For instance, the colony-forming assay requires 2–3 months when using fibroblasts, while it can provide results in 2 weeks with lymphocytes; however, more work needs to be done before its transfer to the clinic [37]. Other fibroblast-based assays with a faster turnover between sample collection and result delivery have been adapted to lymphocytes and will be detailed in this review. Table 1 compares the different assays discussed in this review.

4.1. G2 metaphase and G0 micronucleus formation assays

The G2 metaphase and G0 micronucleus (MN) formation assays were initially used to correlate chromosomal radiosensitivity and predisposition toward breast cancer [53,60]. Since then, several studies have assessed whether these assays could be used to predict late radiation-induced toxicity in normal tissues. Most authors agree that lymphocytes are a good alternative to fibroblasts to study radiosensitivity using these two assays due to the simplicity of working with lymphocytes. In the G2 metaphase assay, lymphocytes are blocked in metaphase and chromosomal aberrations, including exchange type aberrations, acentric fragments and dicentric chromosomes, are quantified in metaphase chromosome spreads. In the G0 MN formation assay, the frequency of radiation-induced MN in peripheral blood lymphocytes is determined and this score is used as an indicator of intrinsic radiosensitivity. However, several authors claimed that in the present form, these assays are unlikely to be of help for the prediction of normal tissue radiosensitivity in the clinic [54,56,57]. A correlation was indeed observed between the number of chromosomal aberrations and fibrosis rate in breast cancer patients, but this association was not significant [61]. Other authors confirmed a correlation between the level of chromosomal damage and late radiation-induced toxicity in

normal tissue using a modified G2 MN formation assay, in which cells are incubated with caffeine after irradiation [55,62]. Caffeine sensitizes G2-phase cells to radiation by abrogating the ATM-dependent 'early' G2/M checkpoint and by decreasing homologous recombination [63]. Similarly, Vandevoorde et al. could demonstrate in patients with breast cancer a positive correlation between MN number and the severity of late radiation-induced effects after modifying the G2 MN formation assay protocol to abrogate the G2/M checkpoint. Specifically, the MN number was significantly higher in cases (patients with late toxicity) than in controls (without late toxicity after RT), demonstrating the association between late radiation-induced toxicity in normal tissue and DNA misrepair.

4.2. Residual phosphorylated H2AX foci

In recent years, quantification of phosphorylated histone H2AX (γ -H2AX) foci has been commonly used to monitor DNA DSB formation and to understand the different pathways involved in DNA damage. The phosphorylated form of H2AX is called γ -H2AX because it was first observed in cells exposed to γ -rays. Upon DSB formation, H2AX molecules are rapidly phosphorylated. This is one of the earliest events detected in cells after exposure to ionizing radiation [64–66]: γ -H2AX appears within minutes and peaks after 30 min. The number of γ -H2AX foci can be measured by using specific antibodies against γ -H2AX. This assay has been tested in many clinical studies for various radiobiological applications, such as biodosimetry, radiosensitivity, prediction of tumor response *in vitro*, prediction of RT (alone or in combination with chemotherapy) side effects in normal tissues in cancer patients [67]. Several groups have hypothesized a correlation between the number of residual γ -H2AX foci after a certain time and radiation toxicity; however, assessment of the correlation between residual DNA DSBs (γ -H2AX foci) and late radiation toxicities led to conflicting results. Some studies showed that the kinetics of γ -H2AX foci correlates with late radiation-induced toxicity [38,47,48] while others did not observe an association between γ -H2AX foci kinetics and normal tissue sensitivity [39,49–52]. In these

Table 1. Comparison of the available assays to predict individual radiosensitivity.

Assay	Tissue sample	Assay completion time	Advantages	Disadvantages	Level of evidence ^b	References
RILA	Blood sample	4 days	Validated in prospective setting Rapid Validated by several international teams	Molecular mechanism unclear	I	[38–46]
Residual γ -H2AX foci	Blood sample	2–3 days	Comparison with other lymphocyte-based assays Rapid Can be used to assess response to chemotherapy <i>in vitro</i>	Large interobserver variation Low reproducibility	IV	[38,39,47–52]
G2 metaphase	Blood sample	6 days	Comparisons with other lymphocyte-based assays	Nonstatistically significant in prospective studies	IV	[53–55]
G0 micronuclei	Blood sample	8 days	Comparisons with other lymphocyte-based assays	Nonstatistically significant in prospective studies	IV	[53,56,57]
Fibroblast-based assay	Skin biopsy	6–8 weeks	Molecular mechanism clearly identified	Long completion time (not applicable in routine clinical practice) No prospective study Invasive (skin biopsy) Acute and late toxicity analyses often overlapped	IV	[23–27,29]

RILA: radiation-induced lymphocyte apoptosis.

^bLevel of evidence based on the REMARK guidelines [58,59].

studies, even though the technique seems to be reproducible and sensitive, the comparison of phospho-H2AX levels showed no significant differences between peripheral blood lymphocytes of radiosensitive and nonradiosensitive patients. It is worth to note that the protocols used to measure the kinetics of γ -H2AX foci (visual assessment of foci by fluorescent microscopy versus flow cytometry assay, which is less sensitive) as well as the control groups of patients (no late or mild late radiation-induced toxicity) differ among studies. Moreover, a recognized drawback of the residual γ -H2AX assay is the huge interindividual biological variation of radiation responses that requires large cohorts for its clinical validation and limits its reliability for radiosensitivity prediction in the clinic.

Chua et al. analyzed residual DSBs and chromosomal damage in the same group of patients. They observed higher level of residual γ -H2AX foci and of deletion-type aberrations in *ex vivo* irradiated lymphocytes from patients with late severe post-RT effects than in patients without or minimal late toxicity. This suggests that DSB repair has a role in the development of late radiation-induced toxicity in normal tissue [47]. They also detected higher numbers of exchange type chromosomal aberrations in radiosensitive patients and suggested that DSB misrepair could influence the occurrence of late post-RT effects.

4.3. Radiation-induced lymphocyte apoptosis assay

In the late 90s, Ozsahin et al. developed a rapid and simple test for intrinsic radiosensitivity based on lymphocyte apoptosis (radiation-induced lymphocyte apoptosis, RILA, assay) [40,68]. After irradiation (8 Gy) of fresh blood samples, CD8⁺ T lymphocytes are sorted and apoptosis is assessed by using flow cytometry after staining with propidium iodide to measure the fluorescence signal of nuclear DNA (Figure 2). The RILA assay is reproducible and shows a good correlation in CD4⁺ and CD8⁺ cells from healthy donors (Pearson correlation; $r = 0.77$ for both), although CD8⁺ T lymphocytes display a higher rate of radiation-induced apoptosis.

Based on these preliminary results, the same authors used the RILA assays to assess radiation-induced T lymphocyte apoptosis in patients with cancer and with (hypersensitive patients) or without severe acute and/or late RT toxicities and in patients with DNA repair-related diseases (Nijmegen breakage syndrome and ataxia telangiectasia) [35,36]. In these two retrospective studies, they found that hypersensitive cancer patients and patients with DNA repair-related diseases

showed lower rate of radio-induced T lymphocyte apoptosis than age-matched controls. A prospective study was then conducted to determine whether the RILA assay could help identifying patients at high risk of severe toxicities [41]. The RILA assay was performed in 399 patients with different cancer types before RT. Findings confirmed that patients who developed severe toxicities displayed a compromised apoptotic response. A small study involving 25 patients and two centers demonstrated that the RILA rates obtained using the same samples by two different laboratories were comparable, showing the robustness of the assay [69]. More recently, the RILA assay has been validated in a prospective multicenter trial with more than 500 patients with breast cancer [40]. The negative predictive value for grade ≥ 2 breast fibrosis was 91% for RILA scores $\geq 20\%$ and the positive predictive value was 22% for RILA scores $< 12\%$ (the overall prevalence of grade ≥ 2 breast fibrosis was estimated at 14%). For the first time, RILA as a continuous variable was significantly associated with toxicities and, therefore, a multi-parameter nomogram for toxicity prediction is currently under development. In the CO-HO-RT trial, the RILA assay was used as the main stratification factor and no late toxicity occurred in patients with a RILA score $> 16\%$ [70,71]. The molecular mechanism linking compromised RILA and late toxicity is still unclear. One could hypothesize that a slow apoptotic response in irradiated lymphocytes promotes cytokine production and attracts inflammatory immune cells that could be at the origin of late toxicities. Several studies are currently investigating this hypothesis and trying to bring some insights into the molecular mechanism. In addition, two SNPs are significantly associated with low RILA scores: rs1182531 ($p = 4.2 \times 10^{-9}$) and rs1182532 ($p = 3.6 \times 10^{-8}$) within the *PHACTR3* gene on chromosome 20q13.33 [71].

Other groups have used the RILA assay to predict clinical toxicity in different cancer types. Pinkawa et al. evaluated the assay in 50 patients with prostate cancer and observed a good correlation between late effects and the low RILA rate [39]. Bordón et al. showed that it was possible to estimate the radiosensitivity of patients with head and neck cancer with the RILA assay. The test was performed on peripheral blood lymphocyte from 79 patients using annexin V/propidium and the lymphocytes were marked with CD45 antibody [42]. They also investigated apoptosis of CD4⁺/CD8⁺ T lymphocytes, B lymphocytes, and natural killer (NK) cells in 94 patients with cervical cancer who underwent RT. They confirmed that CD8⁺ T lymphocytes can predict differences in late toxicity and showed, for the first time, that B lymphocytes also can be

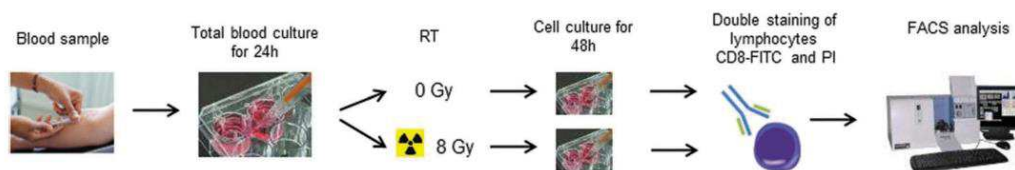


Figure 2. RILA assay. After blood sample collection, blood is diluted in RPMI medium (1:10) and cultured at 37°C, 5% CO₂ for 24 h prior to *ex-vivo* irradiation (0 or 8 Gy). Irradiated whole blood is then cultured as before. After 48 h of culture, red blood cells are lysed and the remaining cells are labeled with FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibodies to select CD8⁺ T-lymphocytes that are then stained with propidium iodide (PI). Cells are analyzed by flow cytometry to determine the percentage of apoptotic cells.

used to predict late toxicity [43]. Foro et al. confirmed in 214 patients with prostate cancer that the radiation-induced apoptosis rate of CD4⁺ T lymphocytes is associated with the probability of developing late genitourinary toxicity and that the radiation-induced apoptosis rate of CD8⁺ T lymphocytes is associated with overall survival [44]. Fuentes-Raspall et al. analyzed radiation-induced apoptosis in total T lymphocytes, CD8⁺ T lymphocytes, CD4⁺ T lymphocytes, and the CD8⁺ subset of NK lymphocytes [45]. They also summarized the results on the association between the radiation-induced apoptosis rate in the different cell types and clinical RT-induced toxicity published up to 2014. They found that breast cancer patients with late RT toxicity showed less induced apoptosis for all T lymphocytes except for CD8 NK cells. CD8 NK cells have a different response to *ex vivo* irradiation compared to CD8 T lymphocytes. Indeed, CD8⁺ NK cells were the most radio-resistant cells, while CD8⁺ T lymphocytes showed the greatest radiosensitivity, even compared with CD4⁺ T lymphocytes. These data are in agreement with the study by Bordón et al. who did not recommend using CD8⁺ NK cells to predict late toxicity [43]. More recently, other authors showed in patients with rectal cancer that besides the prediction of late toxicity, CD8⁺ T lymphocyte apoptotic rate can be used also to predict the therapeutic outcome [46]. On the other hand, Chua et al. did not observe any difference in the mean apoptosis rate between patients and controls. However, their RILA assay protocol differs from that of Azria et al. because after lymphocyte irradiation, they use a caspase fluorogenic inhibitor to study apoptosis, instead of annexin V/propidium iodide and this could explain these differences [72]. Other authors were not able either to correlate individual radiosensitivity with the rate of apoptosis [50]. However, their protocol differed in many ways, including sample preparation. Purified lymphocytes were frozen in liquid nitrogen before the assay, whereas authors who found a significant correlation between lymphocyte apoptosis rate and late radiation-induced effects used freshly collected blood [38–40,42,44]. The poor methodology design of the other published studies does not allow drawing definitive conclusions.

Finally, the French multicenter prospective trial confirmed the significant correlation between low risk of late toxicity and high radiation-induced CD8⁺ T lymphocyte rate. This strongly supports the clinical utility of the RILA assay as a predictor of late radiation-induced toxicity (level I evidence) [40].

5. Comparison of lymphocyte-based assays to predict late radiation-induced toxicity

Often, small studies have reported contradicting results using the same assay due to protocol differences, confounding factors linked to the patients, and the scoring method used to evaluate late radiation-induced toxicity. An interesting small-scale, proof-of-principle study compared four cellular assays using peripheral blood lymphocytes from the same group of cancer patients [38]: RILA assay in CD8⁺ T lymphocytes to study cell apoptosis [40], residual γ -H2AX/53BP1 foci to quantify residual DNA DSBs for studying DNA repair kinetics [47], G2 metaphase and G0 MN formation to assess chromosomal radiosensitivity and to study DNA misrepair at different phases

of the cell cycle [60]. Twelve patients with breast cancer and severe late effects (cases) were selected and matched with 12 patients with minimal or no late reaction (controls). The G0 MN and G2 metaphase assays, which should predict radio-toxicity in patients with breast cancer, did not perform well compared with the other assays [38]. Specifically, the G0 MN assay had a very high background due to the elevated number of spontaneous chromosomal aberrations. Then, even after correction of the MN values for the age difference between cases, the difference between cases and controls was not significant [38]. The G2 metaphase assay could discriminate between cases and controls and correlated the development of late toxicity in normal tissue with a less efficient DNA repair. The γ -H2AX/53BP1 focus assay, which has the highest number of contradictory results in the literature, showed a positive correlation between residual γ -H2AX/53BP1 levels 24 h after lymphocyte irradiation (4 Gy X-rays) and late toxicity in normal tissue, in agreement with Chua et al. [47]. This indicates that the γ -H2AX/53BP1 focus assay could be used to predict late radiation-induced effects. The RILA assay with irradiated CD8⁺ T lymphocytes (8 Gy) showed the best performance among the four assays. The CD8⁺ T lymphocyte apoptosis rate was significantly lower in cases (average: 14.45%) than in matched controls (average: 30.64%) for 11 of the 12 case–control pairs ($p < 0.01$), despite the substantial overlap in standard deviations in most case–control pairs [38]. Comparison between the H2AX/53BP1 focus assay and RILA assay in CD8⁺ T-lymphocytes, which could both discriminate between cases and controls, did not show any correlation, probably due to the protocol differences (radiation dose, cell subsets, culture conditions, and time post-irradiation) [38,72].

Pinkawa et al. evaluated the γ -H2AX, G2 metaphase and RILA assays in 25 patients with prostate cancer and reported that the RILA assay using peripheral blood lymphocytes appeared to be the most promising predictive assay in prospective clinical trials [39]. Conversely, Greve et al. tested several assays and found that the γ -H2AX and RILA assays failed to predict individual radiosensitivity in the 15 patients under study (patients with head and neck or breast cancer) [50], probably due to protocol differences, as discussed previously. The method to evaluate the RILA rate appears to be of extreme importance and it is difficult to compare data from different laboratories that use slightly modified protocols, relative to the original technique described by Ozsahin et al. in 1997 [68].

Overall, the validity of predictive assays can be assessed using the REMARK guidelines, developed to standardize studies on tumor markers [58]. Based on these criteria, the American Society of Clinical Oncology recommends five levels of evidence to evaluate the clinical utility and reliability of prognostic and predictive biomarkers [59]. Among the assays reviewed here, only the RILA assay qualifies as grade I level of evidence (Table 1). The other lymphocyte-based assays were assessed in prospective trials, but these studies did not yield statistically significant results.

6. Conclusion

In the clinic, a robust and rapid assay to predict the patients' susceptibility to develop late radiation-induced

toxicity is undeniably needed. As fibroblast-based assays are time consuming (6–8 weeks) and labor intensive, several lymphocyte-based tests have been developed (clonogenic, γ -H2AX focus kinetics, G2 metaphase and G0 MN and RILA assay) and tested to evaluate their potential usefulness in predicting late RT toxicity in normal tissue. Most of these assays have not yet been clinically validated in large cohorts of patients, except the RILA assay (more than 500 patients with breast cancer [40] and more than 200 patients with prostate cancer [44]). The residual γ -H2AX focus assay shows promising results, but the absence of validation in large cohort studies limits its use for general prediction of late RT effects. Some authors reported that both the RILA and the γ -H2AX focus assay cannot predict radiosensitivity in cancer patients, but this result was certainly due to the modifications brought to the protocols. Comparison of lymphocyte-based assays (γ -H2AX focus kinetics, G2 metaphase and G0 MN and RILA assay) showed that the RILA tests perform best among the tested assays [38,39]. However, several issues concerning radiation toxicity prediction still need to be tackled. Particularly, the assay protocols and the radiation toxicity evaluation in patients should be standardized across laboratories. The experimental variability linked to interindividual heterogeneity also seems to be important in all the tested assays. In addition, several factors could influence radiosensitivity, such as gender, ethnicity, body mass index, diet and alcohol consumption; however, their specific contribution has not yet been confirmed [9]. These predictive assays should be included in multivariate models that include therapeutic factors and smoking habits. New studies including nomograms are needed to change the clinical practice according to the late radiation-induced toxicity risk of each patient and evaluate cost utility of the markers.

7. Expert commentary

Stratifying patients according to their risk of radiation-induced toxicity and modulating the RT dose are key issue for personalized RT [73,74]. The studies on the radiation- RILA assay have demonstrated its potential for clinical applications. Indeed, several laboratories have correlated a low RILA score with the severity of late post-RT effects in patients with breast, prostate, head and neck, cervical, and rectal cancer [38–40,43,44,68]. Moreover, RILA score correlation with late radiation-induced toxicity has been validated in two studies with a large sample of patients with breast cancer [40] or prostate cancer [44]). Importantly, the RILA assay is easy, fast, and minimally invasive because it requires only a small amount of blood. Therefore, it could be easily transferred to the clinic for routine testing of patients before RT to determine whether they are at risk or not of developing late side effects.

New clinical trial designs that include the assessment of the risk of RT toxicity and of local recurrence should now be implemented in routine clinical practice. One of the clinical predictive assays resulted in a patented nomogram in breast indications (NovaGray Breast®, <http://www.nova-gray.com>) to evaluate the risk of late toxicity taking into account independent clinical parameters and the RILA assay. For patient at low

risk of toxicity, a hypofractionated regimen could be proposed leading to a treatment time reduction and a cost-utility advantage. A specific NovaGray Prostate® nomogram will be developed when the results of the second multicenter French trial (ClinicalTrials.gov, number NCT00893035) will be available and published at the end of 2017. These predictive assays could help identifying patients at high risk of recurrence and low risk of toxicity to whom doctors could propose a higher boost dose, concomitant systemic therapies, or target volume extension to increase local control and clinical benefit without severe toxicities. In patients at high risk of toxicities, the risk of poor outcome (cancer relapse) will be evaluated and the type of treatment decided on the basis of the overall clinical benefit. For example, for patients at low risk of prostate cancer recurrence but at high risk of late toxicity, active surveillance could be proposed as an alternative to RT.

Many personalized treatments could be similarly designed to construct the RT of the future. There is no doubt that personalized RT based on the results of radiotoxicity prediction tests and on the tumor radio-response will be the standard of care in the near future, as it is already the case for targeted therapies in medical oncology. One size will no longer fit all! [75]

8. Five-year view

Many efforts have been made to develop assays to predict susceptibility to radiation injury in order to personalize RT protocols. There is compelling evidence that lymphocytes are a recurring feature in normal tissues damaged by radiation, although their functional significance has not been fully determined yet [30]. Some areas of research are focusing on the tumor environment because there is increasing evidence that RT causes significant alterations in the tumor microenvironment, particularly in tumor-infiltrating immune cells [76]. Indeed, it is currently thought that the balance induced by irradiation between the normal tissue microenvironment and the immune system is decisive for controlling the extent of tissue damage and regeneration/replacement and the degree of local immunity response following exposure [30]. Identifying the pathways that mediate the RT-induced changes in the microenvironment could effectively bring some answers to the mechanistic puzzle surrounding the correlation between toxicity in normal tissues and lymphocytes.

The RILA assay has been validated in a multicenter trial with more than 500 patients with breast cancer and several laboratories have shown a correlation between the toxicity severity and low RILA score. These promising results and future data from ongoing clinical research should further validate the RILA assay for routine use in clinical practice with the aim of adapting RT treatment to each patient. Moreover, recent advances in multicolor flow cytometry could be used to better characterize the CD8⁺ subpopulation that is sensitive to radiation-induced apoptosis. Notably, the use of multicolor antibody combinations in the RILA assay could bring information on the activation (CD25, CD38, CD69), differentiation (CD45RA, CCR7), and exhaustion (TIM-3, PD1) status of the

CD8⁺ population and consequently on the molecular mechanism of the lymphocyte apoptosis assay and its correlation with radiation-induced late toxicity.

The RILA assay is already implemented in some hospitals, given its short completion time (under 1 week). Despite the lack of clear recommendation regarding the need or timing of the test in patient management, two trends seem to have developed. The first is the evaluation of individual radiosensitivity before treatment for patients with a history of diseases that would suggest a higher risk of toxicity, such as systemic sclerosis, lupus or constitutive mutations of genes involved in the DNA-repair pathways (such as BRCA1). In these cases, a low level of lymphocyte apoptosis (under 12%), suggesting that the patient might be at higher risk for late toxicity, would result in a change in fractionation (from a hypofractionated to a normo- or hyperfractionated regimen) or target volumes (to avoid critical organs at risk). Oppositely, patients with a high lymphocyte apoptosis rate (over 20%) could be offered a shorter hypofractionated treatment regimen. The second trend is assessing patient radiosensitivity in case of severe late toxicity. Whereas this could not result in a change of treatment plan, it might promote alternative therapies (such as surgery or chemotherapy) in case of local recurrence.

Meanwhile, other assays with promising results, such as the γ -H2AX focus kinetics assay, might be validated in large cohorts of patients and this could lead to its transfer to the clinical practice. In terms of RT changes, hyperfractionation can reduce toxicity with no risk of loss of local control and allows dose escalation in very sensitive patients. For more resistant patients, a dose increase should be possible and hypofractionation regimens could be proposed, possibly in combination with new targeted or existing systemic therapies [9], leading to clinical and economical improvements in patient management. A recognized challenge in the development of reliable assays to predict late radiation-induced toxicity is the wide interindividual variation of radiation response within a patient population. Perhaps, the use of two different assays could overcome this issue.

In conclusion, there is no doubt that personalized RT driven by companion tests of radiotoxicity but also of tumor radio-response will be the standard of care in the near future, as it is already the case for targeted therapies in medical oncology.

Key issues

- Several assays have been developed to predict late radiotherapy effects: γ -H2AX foci kinetics, G2 and G0 micronuclei and lymphocyte apoptosis assay.
- One of the challenges is the clinical validation of these different assays in large groups of patients in order to be used in routine clinical practice.
- Small studies often yield contradictory results mainly due to protocol modifications and differences in radiation-induced toxicity evaluation. Intra-laboratory comparative studies on the same population of patients are very useful.
- Results using one assay in a specific patient population cannot be easily transferred to other populations.
- The γ -H2AX focus kinetics and CD8⁺ T-lymphocyte apoptosis (RILA) assays seem to be the most promising predictive

tests of late radiation-induced effects. The RILA assay shows the best correlation between low lymphocyte apoptosis rate and toxicity severity.

Acknowledgments

The authors would like to thank V. Lafont for sharing her expertise in flow cytometry. This study was supported by the SIRIC Montpellier Cancer (Grant INCA-DGOS-Inserm 6045).

Funding

This paper was not funded.

Declaration of interest

D. Azria declares NovaGray, stock options. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

References

Papers of special note have been highlighted as either of interest (*) or of considerable interest (**) to readers.

1. Ward JF. DNA damage as the cause of ionizing radiation-induced gene activation. *Radiat Res.* 1994;138(1 Suppl):S85–88.
2. Bonnaud S, Niaudet C, Pottier G, et al. Sphingosine-1-phosphate protects proliferating endothelial cells from ceramide-induced apoptosis but not from DNA damage-induced mitotic death. *Cancer Res.* 2007;67(4):1803–1811.
3. Jackson SP. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis.* 2002;23(5):687–696.
4. Vieillot S, Fenoglio P, Moscardo C-L, et al. [Which intensity modulated radiation therapy? From "step and shoot" to volumetric modulated arc therapy, point of view of the radiation oncologist]. *Cancer Radiother J Soc Francaise Radiother Oncol.* 2010;14(6–7):550–553.
5. Marks LB, Yorke ED, Jackson A, et al. Use of normal tissue complication probability models in the clinic. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010;76(3 Suppl):S10–19.
6. Andreassen CN, Rosenstein BS, Kerns SL, et al. Individual patient data meta-analysis shows a significant association between the ATM rs1801516 SNP and toxicity after radiotherapy in 5456 breast and prostate cancer patients. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol.* 2016. pii: S0167–8140(16)31177–X. doi: 10.1016/j.radonc.2016.06.017. [Epub ahead of print].
7. Kerns SL, Dorling L, Fachal L, et al. Meta-analysis of genome wide association studies identifies genetic markers of late toxicity following radiotherapy for prostate cancer. *EBioMedicine.* 2016;10:150–163.
8. Barnett GC, Coles CE, Elliott RM, et al. Independent validation of genes and polymorphisms reported to be associated with radiation toxicity: a prospective analysis study. *Lancet Oncol.* 2012;13(1):65–77.
- **Table with 98 SNPs selected from the literature review up to 2011**
9. Barnett GC, Kerns SL, Noble DJ, et al. Incorporating genetic biomarkers into predictive models of normal tissue toxicity. *Clin Oncol.* 2015;27(10):579–587.
10. Kerns SL, Kundu S, Oh JH, et al. The prediction of radiotherapy toxicity using single nucleotide polymorphism-based models: a step toward prevention. *Semin Radiat Oncol.* 2015;25(4):281–291.
11. Kerns SL, West CML, Andreassen CN, et al. Radiogenomics: the search for genetic predictors of radiotherapy response. *Future Oncol Lond Engl.* 2014;10(15):2391–2406.

12. Stone HB, Coleman CN, Anscher MS, et al. Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *Lancet Oncol*. 2003;4(9):529–536.
- **A valuable review describing radiation-induced late and acute effects on different tissues**
13. Bentzen SM, Thames HD, Overgaard M. Latent-time estimation for late cutaneous and subcutaneous radiation reactions in a single-follow-up clinical study. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol*. 1989;15(3):267–274.
14. Dörr W. Radiobiology of tissue reactions. *Ann ICRP*. 2015;44(1 Suppl):58–68.
15. Lartigau E, Dubray B, Mornex F. [Biological mechanisms of late effects of ionizing radiations]. *Cancer Radiother J Soc Fr Radiother Oncol*. 1997;1(6):669–676.
16. Delanian S, Lefaix J-L. Current management for late normal tissue injury: radiation-induced fibrosis and necrosis. *Semin Radiat Oncol*. 2007;17(2):99–107.
17. Jain M, Rivera S, Monclus EA, et al. Mitochondrial reactive oxygen species regulate transforming growth factor- β signaling. *J Biol Chem*. 2013;288(2):770–777.
18. Richter K, Konzack A, Pihlajaniemi T, et al. Redox-fibrosis: impact of TGF β 1 on ROS generators, mediators and functional consequences. *Redox Biol*. 2015;6:344–352.
19. Taylor AM, Harnden DG, Arlett CF, et al. Ataxia telangiectasia: a human mutation with abnormal radiation sensitivity. *Nature*. 1975;258(5534):427–429.
20. Tanteles GA, Murray RJS, Mills J, et al. Variation in telangiectasia predisposing genes is associated with overall radiation toxicity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012;84(4):1031–1036.
21. Andreassen CN, Overgaard J, Alsner J, et al. ATM sequence variants and risk of radiation-induced subcutaneous fibrosis after postmastectomy radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006;64(3):776–783.
22. Andreassen CN, Alsner J, Overgaard M, et al. Risk of radiation-induced subcutaneous fibrosis in relation to single nucleotide polymorphisms in TGF β 1, SOD2, XRCC1, XRCC3, APEX and ATM—a study based on DNA from formalin fixed paraffin embedded tissue samples. *Int J Radiat Biol*. 2006;82(8):577–586.
23. Burnet NG, Nyman J, Turesson I, et al. Prediction of normal-tissue tolerance to radiotherapy from in-vitro cellular radiation sensitivity. *Lancet Lond Engl*. 1992;339(8809):1570–1571.
24. Geara FB, Peters LJ, Ang KK, et al. Prospective comparison of in vitro normal cell radiosensitivity and normal tissue reactions in radiotherapy patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1993;27(5):1173–1179.
25. Peacock J, Ashton A, Bliss J, et al. Cellular radiosensitivity and complication risk after curative radiotherapy. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol*. 2000;55(2):173–178.
26. Kaspler P, Chen R, Hyrien O, et al. Biodosimetry using radiation-induced micronuclei in skin fibroblasts. *Int J Radiat Biol*. 2011;87(8):824–838.
27. Oppitz U, Denzinger S, Nachtrab U, et al. Radiation-induced comet formation in human skin fibroblasts from radiotherapy patients with different normal tissue reactions. *Strahlenther Onkol Organ Dtsch Röntgenges Al*. 1999;175(7):341–346.
28. Sasai K, Evans JW, Kovacs MS, et al. Prediction of human cell radiosensitivity: comparison of clonogenic assay with chromosome aberrations scored using premature chromosome condensation with fluorescence in situ hybridization. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1994;30(5):1127–1132.
29. COPERNIC project investigators, Granzotto A, Benadjaoud MA, et al. Influence of nucleoshuttling of the atm protein in the healthy tissues response to radiation therapy: toward a molecular classification of human radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2016;94(3):450–460.
30. Schaeue D, McBride WH. T lymphocytes and normal tissue responses to radiation. *Front Oncol*. 2012;2:119.
31. MacLennan IC, Kay HE. Analysis of treatment in childhood leukemia. IV. the critical association between dose fractionation and immunosuppression induced by cranial irradiation. *Cancer*. 1978;41(1):108–111.
32. Matzinger P, Kamala T. Tissue-based class control: the other side of tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(3):221–230.
33. Pelus LM, Fukuda S. Chemokine-mobilized adult stem cells; defining a better hematopoietic graft. *Leukemia*. 2008;22(3):466–473.
34. Schmitz A, Bayer J, Déchamps N, et al. Intrinsic susceptibility to radiation-induced apoptosis of human lymphocyte subpopulations. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2003;57(3):769–778.
35. Crompton NE, Miralbell R, Rutz HP, et al. Altered apoptotic profiles in irradiated patients with increased toxicity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1999;45(3):707–714.
36. Crompton NE, Shi YQ, Emery GC, et al. Sources of variation in patient response to radiation treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001;49(2):547–554.
37. West CM, Elyan SA, Berry P, et al. A comparison of the radiosensitivity of lymphocytes from normal donors, cancer patients, individuals with ataxia-telangiectasia (A-T) and A-T heterozygotes. *Int J Radiat Biol*. 1995;68(2):197–203.
38. Vandevoorde C, Depuydt J, Veldeman L, et al. In vitro cellular radiosensitivity in relationship to late normal tissue reactions in breast cancer patients: a multi-endpoint case-control study. *Int J Radiat Biol*. 2016;92(12):823–836.
- **Comparison of four radiosensitivity assays for prediction of late normal tissue reactions in a retrospective study with breast cancer patients.**
39. Pinkawa M, Brzozowska K, Kriehuber R, et al. Prediction of radiation-induced toxicity by in vitro radiosensitivity of lymphocytes in prostate cancer patients. *Future Oncol Lond Engl*. 2016;12(5):617–624.
- **Comparison of gamma-H2AX assay, G2 and lymphocyte apoptosis assay tested in prostate cancer patients.**
40. Azria D, Riou O, Castan F, et al. Radiation-induced CD8 T-lymphocyte apoptosis as a predictor of breast fibrosis after radiotherapy: results of the prospective multicenter french trial. *EBioMedicine*. 2015;2(12):1965–1973.
- **Validation of the RILA assay in a prospective multicenter trial with over 500 breast cancer patients.**
41. Ozsahin M, Crompton NEA, Gourgou S, et al. CD4 and CD8 T-lymphocyte apoptosis can predict radiation-induced late toxicity: a prospective study in 399 patients. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2005;11(20):7426–7433.
42. Bordón E, Henríquez-Hernández LA, Lara PC, et al. Prediction of clinical toxicity in locally advanced head and neck cancer patients by radio-induced apoptosis in peripheral blood lymphocytes (PBLs). *Radiat Oncol Lond Engl*. 2010;5:4.
43. Bordón E, Henríquez-Hernández LA, Lara PC, et al. Role of CD4 and CD8 T-lymphocytes, B-lymphocytes and Natural Killer cells in the prediction of radiation-induced late toxicity in cervical cancer patients. *Int J Radiat Biol*. 2011;87(4):424–431.
44. Foro P, Algara M, Lozano J, et al. Relationship between radiation-induced apoptosis of T lymphocytes and chronic toxicity in patients with prostate cancer treated by radiation therapy: a prospective study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2014;88(5):1057–1063.
45. Fuentes-Raspall MJ, Caragol I, Alonso C, et al. Apoptosis for prediction of radiotherapy late toxicity: lymphocyte subset sensitivity and potential effect of TP53 Arg72Pro polymorphism. *Apoptosis Int J Program Cell Death*. 2015;20(3):371–382.
- **Table summarizing the association's studies between radiation-induced apoptosis and clinical toxicity induced by radiotherapy in the different cell types published up to 2014.**
46. Winkler S, Hoppe P, Haderlein M, et al. Ex vivo apoptosis in CD8+ lymphocytes predicts rectal cancer patient outcome. *Gastroenterol Res Pract*. 2016;2016:1–7.
47. Chua MLK, Somaiah N, A'Hern R, et al. Residual DNA and chromosomal damage in ex vivo irradiated blood lymphocytes correlated with late normal tissue response to breast radiotherapy. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol*. 2011;99(3):362–366.
48. van Oorschot B, Hovingh SE, Moerland PD, et al. Reduced activity of double-strand break repair genes in prostate cancer patients with

- late normal tissue radiation toxicity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2014;88(3):664–670.
49. Brzozowska K, Pinkawa M, Eble MJ, et al. In vivo versus in vitro individual radiosensitivity analysed in healthy donors and in prostate cancer patients with and without severe side effects after radiotherapy. *Int J Radiat Biol.* 2012;88(5):405–413.
 50. Greve B, Bölling T, Amler S, et al. Evaluation of different biomarkers to predict individual radiosensitivity in an inter-laboratory comparison—lessons for future studies. *Plos One.* 2012;7(10):e47185.
 51. Olive PL, Banáth JP, Keyes M. Residual gammaH2AX after irradiation of human lymphocytes and monocytes in vitro and its relation to late effects after prostate brachytherapy. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol.* 2008;86(3):336–346.
 52. Werbrout J, De Ruyck K, Beels L, et al. Prediction of late normal tissue complications in RT treated gynaecological cancer patients: potential of the gamma-H2AX foci assay and association with chromosomal radiosensitivity. *Oncol Rep.* 2010;23(2):571–578.
 53. Scott D, Barber JB, Spreadborough AR, et al. Increased chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: a comparison of two assays. *Int J Radiat Biol.* 1999;75(1):1–10.
 54. Finnon P, Kabacik S, MacKay A, et al. Correlation of in vitro lymphocyte radiosensitivity and gene expression with late normal tissue reactions following curative radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol.* 2012;105(3):329–336.
 55. Terzoudi GI, Hatzi VI, Barszczewska K, et al. G2-checkpoint abrogation in irradiated lymphocytes: a new cytogenetic approach to assess individual radiosensitivity and predisposition to cancer. *Int J Oncol.* 2009;35(5):1223–1230.
 56. Barber JB, Burrill W, Spreadborough AR, et al. Relationship between in vitro chromosomal radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes and the expression of normal tissue damage following radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol.* 2000;55(2):179–186.
 57. Padjas A, Kedzierawski P, Florek A, et al. Comparative analysis of three functional predictive assays in lymphocytes of patients with breast and gynaecological cancer treated by radiotherapy. *J Contemp Brachytherapy.* 2012;4(4):219–226.
 58. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, et al. Reporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies (REMARK). *Breast Cancer Res Treat.* 2006;100(2):229–235.
 59. Simon RM, Paik S, Hayes DF. Use of archived specimens in evaluation of prognostic and predictive biomarkers. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(21):1446–1452.
 - **This reference defines guidelines for study design and analysis in trials assessing clinical utility of tumor markers, according to the Levels of Evidence defined by the American Society for Clinical Oncology (ASCO).**
 60. Baeyens A, Thierens H, Claes K, et al. Chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients with a known or putative genetic predisposition. *Br J Cancer.* 2002;87(12):1379–1385.
 61. Hoeller U, Borgmann K, Bonacker M, et al. Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may be used to predict the risk of fibrosis after radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol.* 2003;69(2):137–144.
 62. Claes K, Depuydt J, Taylor AMR, et al. Variant ataxia telangiectasia: clinical and molecular findings and evaluation of radiosensitive phenotypes in a patient and relatives. *Neuromolecular Med.* 2013;15(3):447–457.
 63. Wang X, Wang H, Iliakis G, et al. Caffeine-induced radiosensitization is independent of nonhomologous end joining of DNA double-strand breaks. *Radiat Res.* 2003;159(3):426–432.
 64. Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, et al. GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(12):957–967.
 65. Kinner A, Wu W, Staudt C, et al. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(17):5678–5694.
 66. Rogakou EP, Boon C, Redon C, et al. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol.* 1999;146(5):905–916.
 67. Ivashkevich A, Redon CE, Nakamura AJ, et al. Use of the γ-H2AX assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research. *Cancer Lett.* 2012;327(1–2):123–133.
 - **Review with a non-exhaustive list of clinical studies using γ-H2AX assay.**
 68. Ozsahin M, Ozsahin H, Shi Y, et al. Rapid assay of intrinsic radiosensitivity based on apoptosis in human CD4 and CD8 T-lymphocytes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1997;38(2):429–440.
 - **First paper describes the RILA assay and its correlation with radiosensitivity.**
 69. Mirojet C, Merlin JL, Dalban C, et al. Correlation between radio-induced lymphocyte apoptosis measurements obtained from two French centres. *Cancer Radiother J Soc Fr Radiother Oncol.* 2016;20(5):391–394.
 70. Azria D, Belkacemi Y, Romieu G, et al. Concurrent or sequential adjuvant letrozole and radiotherapy after conservative surgery for early-stage breast cancer (CO-HO-RT): a phase 2 randomised trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(3):258–265.
 71. Bourgier C, Kems S, Gourgou S, et al. Concurrent or sequential letrozole with adjuvant breast radiotherapy: final results of the CO-HO-RT phase II randomized trial. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO.* 2016;27(3):474–480.
 72. Chua MLK, Horn S, Somaiah N, et al. DNA double-strand break repair and induction of apoptosis in ex vivo irradiated blood lymphocytes in relation to late normal tissue reactions following breast radiotherapy. *Radiat Environ Biophys.* 2014;53(2):355–364.
 73. Barnett GC, West CML, Dunning AM, et al. Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(2):134–142.
 74. Bourgier C, Lacombe J, Solassol J, et al. Late side-effects after curative intent radiotherapy: identification of hypersensitive patients for personalized strategy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2015;93(3):312–319.
 75. Azria D, Bourgier C, Brengues M. One size fits all: does the Dogma stand in radiation oncology? *EBioMedicine.* 2016;10:19–20.
 76. Shiao SL, Coussens LM. The tumor-immune microenvironment and response to radiation therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2010;15(4):411–421.



Data-Based Radiation Oncology: Design of Clinical Trials in the Toxicity Biomarkers Era

David Azria^{1*}, Ariane Lapiere^{1†}, Sophie Gourgou¹, Dirk De Ruyscher^{2,3}, Jacques Colinge¹, Philippe Lambin², Muriel Brengues¹, Tim Ward⁴, Søren M. Bentzen⁵, Hubert Thierens⁶, Tiziana Rancati⁷, Christopher J. Talbot⁸, Ana Vega⁹, Sarah L. Kerns¹⁰, Christian Nicolaj Andreassen¹¹, Jenny Chang-Claude^{12,13}, Catharine M. L. West¹⁴, Corey M. Gill^{15,16} and Barry S. Rosenstein^{15,16}

OPEN ACCESS

Edited by:

Sean P. Collins,
Georgetown University School
of Medicine, USA

Reviewed by:

Vinay Sharma,
University of the Witwatersrand,
South Africa
Marianne Aznar,
Rigshospitalet, Denmark

*Correspondence:

David Azria
david.azria@icm.unicancer.fr

[†]These authors have contributed
equally to this work and are
joint first co-authors.

Specialty section:

This article was submitted
to Radiation Oncology,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

Received: 03 February 2017

Accepted: 13 April 2017

Published: 27 April 2017

Citation:

Azria D, Lapiere A, Gourgou S,
De Ruyscher D, Colinge J,
Lambin P, Brengues M, Ward T,
Bentzen SM, Thierens H, Rancati T,
Talbot CJ, Vega A, Kerns SL,
Andreassen CN, Chang-Claude J,
West CML, Gill CM and
Rosenstein BS (2017) Data-Based
Radiation Oncology: Design
of Clinical Trials in the
Toxicity Biomarkers Era.
Front. Oncol. 7:83.
doi: 10.3389/fonc.2017.00083

¹Department of Radiation Oncology, Radiobiology Unit, Biometric and Bio-informatic Divisions, Montpellier Cancer Institute (ICM), IROM, INSERM U1194, Montpellier, France, ²Department of Radiation Oncology, Maastricht University Medical Centre, MAASTRO Clinic, Maastricht, Netherlands, ³Radiation Oncology, KU Leuven, Leuven, Belgium, ⁴Patient Advocate, Manchester, UK, ⁵Department of Epidemiology and Public Health, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD, USA, ⁶Department of Basic Medical Sciences, Ghent University, Ghent, Belgium, ⁷Prostate Cancer Program, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy, ⁸Department of Genetics, University of Leicester, Leicester, UK, ⁹Fundacion Publica Galega de Medicina Xenomica-SERGAS, Grupo de Medicina Xenomica-USC, IDIS, CIBERER, Santiago de Compostela, Spain, ¹⁰Department of Radiation Oncology, University of Rochester Medical Center, Rochester, NY, USA, ¹¹Department of Experimental Clinical Oncology, Aarhus University Hospital, Aarhus, Denmark, ¹²Division of Cancer Epidemiology, German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany, ¹³University Cancer Center Hamburg (UCCH), University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, ¹⁴Division of Cancer Sciences, University of Manchester, Manchester Academic Health Science Centre, Christie Hospital NHS Trust, Manchester, UK, ¹⁵Department of Radiation Oncology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, USA, ¹⁶Department of Genetics and Genomic Sciences, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, USA

The ability to stratify patients using a set of biomarkers, which predict that toxicity risk would allow for radiotherapy (RT) modulation and serve as a valuable tool for precision medicine and personalized RT. For patients presenting with tumors with a low risk of recurrence, modifying RT schedules to avoid toxicity would be clinically advantageous. Indeed, for the patient at low risk of developing radiation-associated toxicity, use of a hypofractionated protocol could be proposed leading to treatment time reduction and a cost-utility advantage. Conversely, for patients predicted to be at high risk for toxicity, either a more conformal form or a new technique of RT, or a multidisciplinary approach employing surgery could be included in the trial design to avoid or mitigate RT when the potential toxicity risk may be higher than the risk of disease recurrence. In addition, for patients at high risk of recurrence and low risk of toxicity, dose escalation, such as a greater boost dose, or irradiation field extensions could be considered to improve local control without severe toxicities, providing enhanced clinical benefit. In cases of high risk of toxicity, tumor control should be prioritized. In this review, toxicity biomarkers with sufficient evidence for clinical testing are presented. In addition, clinical trial designs and predictive models are described for different clinical situations.

Keywords: trial design, patient selection, biomarkers, radiotherapy, toxicity tests

INTRODUCTION

Radiotherapy (RT) is one of the leading treatment modalities in oncology, and over 50% of patients diagnosed with cancer undergo RT during their course of treatment. Although RT is primarily a local treatment, patients are exposed to a risk of toxicities in the treatment field and surrounding tissues, which may develop acutely and late. Early toxicities are defined as side effects occurring during treatment or in the first 3 months after treatment completion. Late toxicities are defined as those occurring more than 3 months following RT and could increase over time for a period of many months to years. Late toxicities often persist and can have a significant negative impact on quality of life among cancer survivors. A sequential effect between early and late toxicity is often reported.

A total of 5–10% of patients will eventually develop severe side effects with a significant impact on treatment outcome or quality of life. Based on this observation and dependent upon the prognosis that reflects the type of tumor and its stage at time of treatment, dose–volume constraints to organs-at-risk are usually chosen in order to keep the risk of developing grade 3 or higher side effects below 5% (1, 2). Due to considerable progress in cancer management in recent decades, the number of cancer survivors has dramatically increased, raising new challenges in the various phases of survivorship. Thus, posttreatment morbidity and quality of life have become a critical concern in the growing patient population (3). However, there is large patient-to-patient variability for the development of adverse outcomes following RT, in terms of both prevalence and severity. While most patients will develop toxicities within the normal range, some patients demonstrate a hypersensitive phenotype and develop severe toxicities even at standard radiotherapeutic doses.

The first example of individual variation in degree of response was described by Holthausen in 1936 (4). Numerous normal tissue complication probability (NTCP) models have since been developed, and variation in normal tissue response has been shown to follow a normal distribution with 5% of patients considered as radiosensitive (5). Identification of these patients beforehand is critical to avoid morbidity because severe toxicities in a minority of patients limit the dose that can be safely delivered to the majority of patients (6). In addition, individualized risk estimation for even mild or moderate effects would provide patients with information as to their risk for complications following treatment and could be used to select patients for interventions designed to prevent or mitigate toxicities. Thus, understanding individual variation is crucial to individualization of RT treatment planning and increased therapeutic outcomes (7).

While early toxicities might compromise treatment completion, they can usually be managed with adequate care. In contrast, late toxicities can significantly affect quality of life in survivors and may require extensive treatments to alleviate symptoms. However, acute radiation reactions are not necessarily an indicator of a predisposition for late toxicity (8). Therefore, there is a need to measure individual radiosensitivity and predict the risk of toxicity before treatment. Even though many external factors such as age, concomitant medications, or recent surgery impact on the risk of toxicity, the main determinant seems to

be genetic factors (i.e., intrinsic radiosensitivity). However, it is unlikely that intrinsic radiosensitivity is the product of a single genetic alteration, and as such, it should be regarded as a complex polygenic trait (7). If a link can be found between underlying genetic variation and normal tissue susceptibility to developing toxicity, then patients could benefit from genomically guided, therapeutic individualization of their treatment: early identification of patients predicted to be at high risk for radiation-induced toxicities may benefit from either RT dose reduction or hyperfractionation. Conversely, identification of patients who are at low risk of toxicity could allow for (i) hypofractionation of the treatment plan, thereby shortening treatment time or (ii) dose escalation, which could improve tumor control (9).

Several observations support the hypothesis that clinical normal tissue radiosensitivity is influenced by genomics. However, very little is known about the genetic architecture of radiosensitivity or the specific genomic variants underlying interindividual differences in normal tissue reactions to RT in unselected cancer patients. It is considered that intrinsic radiosensitivity of a patient should be regarded as a complex trait depending on the combined effect of multiple genomic alterations (9). However, factors other than intrinsic radiosensitivity (i.e., genetically determined) will influence the risk of toxicity (e.g., radiation dose, age, and comorbidities), which highlights the need to collect and include multiple variables in studies.

Several genes involved in response to radiation injury were identified because homozygous mutations resulted in unusually severe reactions to RT (e.g., ATM). Other genes studied were known to be involved in the DNA damage response to ionizing radiation or the development of fibrosis. Most studies to date investigated single nucleotide polymorphisms (SNPs) because of their high prevalence in a population. With the rise of next-generation sequencing and genome-wide assays, genomic studies have been immensely facilitated (10). SNPs associated with radiation injury have been identified using high-throughput genotyping, in genome-wide association studies (GWASs) as well as candidate gene studies (11, 12). However, SNP discovery through GWAS requires a large number of patients to reach statistical significance, and the number of patients who exhibit severe toxicity is relatively low in clinical studies (6). In addition, careful clinical consideration is required when designing radiogenomic studies. While radiation dose is the main factor influencing toxicity, additional factors, including genomic alterations (e.g., SNP) and treatment volume, may be effect modifiers of the dose–toxicity relationship. Other clinical factors such as age, smoking habits (13, 14), or preexisting conditions (autoimmune diseases such as collagen vascular diseases) (15) may influence toxicity independently of genetic background, and so it is important that risk prediction models are not restricted to only genetic or only non-genetic factors.

It is also important to consider the future development of a test for clinical application. Rigorous methodology in choice of hypothesis, methods, and result reporting is required to allow generalization of the results (16) (see also Cancer Research UK predictive biomarker roadmap: http://www.cancerresearchuk.org/prod_consump/groups/cr_common/@fre/@fun/)

documents/generalcontent/cr_027486.pdf). In addition, the methodology developed for reporting tumor markers could be used for evaluating the level of evidence of prognostic normal tissue radiosensitivity markers (17–20). Based on these works, our consortium developed an 18-item checklist for reporting

radiogenomic studies called STROGAR (Table 1), which should stand as reference for any new predictive biomarker development (21).

This study aims to review currently available radiogenomic assays based on level of evidence and clinical relevancy and to

TABLE 1 | STROGAR 18-item checklist for reporting radiogenomic studies from Kerns et al. (21).

	Item number	Recommendations
Title and abstract Title and abstract	1	Include the primary outcome(s) and type of study [whether genome-wide association studies (GWASs) or gene-specific]; provide an informative summary of the study including study design, whether discovery or validation, sample size, main end points, and major results.
Introduction Background/rationale	2	Note if the study is a GWAS or a candidate gene/SNP study and, if candidate gene study, rationale for choice of genes/SNPs; give a general description of the study setting.
Objectives	3	Define the primary/main outcome(s) of interest; describe the overall/long-term goal of the study; note if it is a discovery, validation, or multistage study. Use terminology and definitions from National Cancer Institute biomarker study guidelines (22), where applicable.
Methods Study design	4	Specify the study design (case-control, cohort); whether data were collected under a controlled trial setting; whether data were collected retrospectively or prospectively. Report power and sample size considerations.
Patient population	5	Specify the source(s) of the patients and, if multiple sources, whether they are pooled or treated as separate cohorts; define inclusion/exclusion criteria; report whether comorbidities and medications were assessed by self-report or medical records; define methods/system used for tumor staging; describe the larger patient population from which the study sample was drawn; define how major changes in treatment protocol were handled in the analysis.
Radiation exposure	6	Specify details of radiation treatment parameters including: organ(s)-at-risk, dose-time fractionation; dose rate, target volume selection (e.g., breast + boost), dose to critical substructures, dose-volume metric used, the type of treatment and treatment setting, radiation modality (e.g., external beam vs. brachytherapy), whether single or combined treatment modalities were used, whether primary treatment or salvage therapy, imaging and planning details, ICRU recommendations followed and note relaxation of criteria, note any changes in dose or treatment protocol over the time course of enrollment and whether there were any interruptions in treatment.
Phenotype(s)	7	Specify how inpatient or pretreatment assessment was made and whether it is accounted for in defining phenotype(s); note whether patient-reported outcomes or physician-assessed outcomes are being used to define phenotype(s); note which toxicity scoring system was used (if using a common/standard system); define the grading scales used and whether the phenotype(s) is/are defined as continuous, dichotomous or categorical; describe frequency of follow-up scheduling and diagnostic intensity; define the posttreatment time frame for assessment of toxicity outcomes; describe whether outcome(s) is/are based on a single time point or the maximum/worst time point out of a series of follow-up assessments; note if/how competing risks were handled (such as non-radiation-related manifestation of the phenotype); note any medical intervention that may influence study outcome(s).
Genotyping strategy and quality control (QC)	8	Specify DNA source and isolation methods; note the methods/platform used for genotyping; specify whether genotyping was done in one stage or multiple stages; note whether genotyping was done in more than one lab or batch, and if so, how batch effects were handled; describe methods for genotype calling and cite the algorithm used; note whether genotype calling was done for the whole study sample together or in batches; describe QC methods including concordance between duplicates, control samples, and checks for cryptic relatedness; describe methods for assessing population structure; describe SNP/CNP filtering methods including filtering on per-sample call rate, per-SNP call rate, minor allele frequency, and Hardy-Weinberg equilibrium; note whether imputation was used and, if so, describe methods.
Data analysis and statistical methods	9	Define the statistical methods and models used for association testing; cite the software and settings used; describe how censoring was handled; define model selection methods used for multivariable models; describe whether all samples are analyzed together or sequentially if the study involves multiple cohorts; for multistage studies, define methods for selecting variants to follow-up in subsequent stages; describe how missing data were handled; if multiple cohorts were included, describe data harmonization methods; note whether gene-gene interaction or gene-environment interaction was investigated; describe methods used to adjust for population structure; describe methods used to correct for multiple comparisons and/or control for risk of false-positive findings.

(Continued)

TABLE 1 | Continued

	Item number	Recommendations
Results		
Patient characteristics	10	Report number of individuals at each stage of the study (e.g., numbers examined for eligibility, numbers confirmed eligible, included in study, completed follow-up, successfully genotyped and analyzed). Give reasons for non-participation at each stage. Give description of the included patient sample regarding demographic (e.g., age at start of therapy, sex, race/ethnicity) and clinical characteristics (e.g., site and stage of primary tumor, chemotherapy, hormone therapy), details of radiation exposure, where appropriate (e.g., type, dose, boost) and potential confounders and effect modifiers (e.g., lifestyle-related factors, comorbidities, and medications), including missing data; report length of follow-up and number of events and number of patients at risk at various follow-up times, e.g., yearly. It is recommended to include a flow diagram of patients included/excluded from the study, as proposed by the CONSORT statement.
Phenotype(s)	11	Report baseline function (if relevant); report numbers of responders and non-responders for dichotomous outcomes, descriptive statistics for quantitative outcome(s), or distributions for categorical outcomes.
Genotypes	12	Report call rates; numbers of samples and numbers of SNPs excluded on the basis of QC filters; if imputation was used, note which variants are imputed and which are genotyped directly; report genetically determined racial/ethnic groups or other population clusters; report genomic inflation factor as well as corrected genomic inflation factor after controlling for population structure.
Primary associations	13	For each SNP/CNP, report: common identifier (such as dbSNP rs number), minor allele identity and frequency, phenotype by genotype category, effect size (with 95% confidence interval) and p-value; genetic inheritance model(s) used; for multivariable analyses, report unadjusted and adjusted estimate and note which covariates were included in the model(s).
Secondary analyses	14	Report subgroup analyses and/or secondary outcomes of interest.
Discussion		
Key results	15	Summarize key results in the context of the study objectives given in Section "Introduction."
Limitations	16	Discuss limitations of the study in the context of bias (noting both direction and size), confounding, sample size and power, and representativeness of study population.
Interpretation	17	Provide an overall interpretation of the findings in the context of previous clinical studies, genetic association studies, and biological studies of radiation response.
Generalizability and clinical utility	18	Comment on the potential clinical utility of the findings in the context of the patient populations to which the results may apply.

evaluate potential ways in which these assays might be implemented in routine clinical practice.

AVAILABLE RADIOGENOMIC BIOMARKERS AND THEIR RESPECTIVE LEVELS OF EVIDENCE

SNP Association Studies

The initial research performed in radiogenomics involved candidate gene studies, which focused on genes encoding proteins with known associations with pathways involved in responses to radiation, such as DNA repair processes and cell cycle checkpoint control. Although a number of positive associations were reported, these studies often did not adequately correct for multiple hypothesis testing and generally were not validated in subsequent studies, with several notable exceptions described below. More recent advances in radiogenomics research have been achieved through use of SNP microarrays and the performance of GWASs in which large numbers of SNPs across the genome have been evaluated. Using both of these approaches, several large studies have been accomplished involving a rigorous analysis for association between particular SNPs and toxicity outcomes that

follow the STROGAR guidelines for reporting radiogenomic studies (Table 1) (21).

The most progress has probably been made in identifying specific SNPs associated with late toxicity following RT for prostate cancer. The first radiogenomics GWASs performed aimed to identify SNPs associated with erectile dysfunction in African-American men treated with RT for prostate cancer (23). Through this study, a SNP (rs2268363) in the FSHR gene, which encodes follicle-stimulating hormone, was identified (unadjusted p -value = 5.46×10^{-8} ; Bonferroni p -value = 0.028). In another prostate cancer study, a three-stage GWAS was conducted using discovery and replication cohorts that included the use of Standardized Total Average Toxicity (STAT) score (24) as a measure of overall toxicity, combining urinary and rectal end points. A locus encompassing the TANC1 gene was associated with STAT score for overall late toxicity (25) with an odds ratio (OR) of ~6 (combined p -value = 4.64×10^{-11}). More recently, a GWAS meta-analysis was performed using data from four cohorts of men treated for prostate cancer for whom toxicity was measured at 2-year post-RT (26). Two SNPs were identified in this study that met genome-wide significance. One was rs17599026, which resides on chromosome 5q31.2 and associated with urinary frequency and characterized by an OR of 3.1 (95% confidence

interval 2.1–4.7, $p = 4.2 \times 10^{-8}$). rs7720298, which is situated on chromosome 5p15.2, was associated with decreased urine stream with an OR of 2.7 (95% CI 1.9–3.9, p -value = 3.2×10^{-8}). This SNP is located in an intronic region downstream of DNAH5 exon 30. Using a candidate gene approach, a study of more than 5,000 patients who underwent RT for either prostate or breast cancer reported an association between overall toxicity and rs1801516 in the ATM gene with ORs of 1.5 for acute and 1.2 for late toxicity (27).

Several other studies have been successful in identification of SNPs associated with the development of adverse normal tissue outcomes following RT for breast cancer. For example, a study comprising four SNPs related to the TGF β pathway reported associations with several outcomes, including breast induration, telangiectasia, and overall toxicity (28). Significant and replicated associations with adverse outcomes following breast RT were reported for the TNF SNP rs1800629 and rs2857595, which is located 25.7 kb from rs1800629 and resides in the intergenic region between NCR3 and AIF1. Another validated study of breast cancer patients identified SNP rs1139793 in TXNRD2 associated with subcutaneous fibrosis following RT (29). A separate study used a two-stage design to investigate associations between SNPs in genes whose products are involved with responses to oxidative stress with toxicities following radiation treatment of women diagnosed with breast cancer. The rs2682585 SNP in XRCC1 (30) was found to be associated with reduced risk for skin toxicities (OR 0.77, 95% CI 0.61–0.96, $p = 0.02$) and decreased STAT scores (-0.08 , 95% CI -0.15 to -0.02 , $p = 0.016$).

Several candidate gene SNP studies have successfully identified and validated SNPs associated with late RT toxicity in lung cancer. It was reported in studies of patients treated with RT for non-small-cell lung cancer (NSCLC) that the HSPB1 rs2868371 SNP was associated with grade 3 or greater radiation pneumonitis (31) in both the training ($p = 0.031$) and validation sets ($p = 0.025$) and that this SNP was also associated with the development of grade 3 or greater radiation-induced esophagitis (32) in both the training ($p = 0.045$) and validation cohorts ($p = 0.031$). In addition, it was reported that the TGF β 1 rs1800469 SNP was associated with a higher risk of radiation esophagitis in both the training ($p = 0.045$) and validation (0.023) sets of NSCLC patients (32).

While much work remains to be done in order to identify the many radiosensitivity SNPs that likely remain undiscovered, the studies published to date represent an important step toward development of polygenic risk models. Furthermore, the GWASs have contributed to uncovering novel radiation biology genes and pathways. Functional studies of these genes will provide important information for development of pharmacological interventions to prevent or mitigate the toxic effects of radiation on normal tissues.

Fibroblast-Based Assays

Fibroblasts have traditionally been the gold-standard considered to be the best model of normal tissue for RT studies, given the importance of fibrosis in late effects and that these cells play a large role in the supporting cellular networks that surround tumors outside of the central nervous system. The first study of this model was conducted by Burnet et al. in 1992 (33). Since

then, several studies suggested that fibroblast radiosensitivity *in vitro* could predict early toxicity risk. This association was studied in the clinical setting, in breast and head and neck cancer, where fibroblast clonogenic survival after irradiation was associated with radiation-induced toxicity in patients (34). However, to date, no prospective study has been able to demonstrate a significant association between fibroblast radiosensitivity and radiation-induced toxicity in patients (35, 36).

Radiation-Induced Lymphocyte Apoptosis (RILA) Assay

In response to the limited success of fibroblast-based tests, lymphocyte-based assays were developed in their stead. While clonogenic assays showed promise in a prospective setting and in multivariable analysis (37), the 2-week assay time was considered a barrier to clinical implementation. Therefore, Ozsahin et al. developed an assay based on CD8+ T-lymphocyte apoptosis after *in vitro* irradiation with a single 8-Gy dose (38). While no association between lymphocyte apoptosis and early toxicities was found in multivariate analyses, CD8+ T-lymphocyte apoptosis was significantly associated with late effects in various cancers in a single-center prospective trial (39) and recently confirmed in a prospective multicenter study for late breast fibrosis (40). Furthermore, this assay has been shown to be reproducible between laboratories, making it a robust test to assess individual radiosensitivity (39, 41). As such, several prospective trials are currently assessing the clinical validity of the RILA assay in different cancer settings, such as prostate or lung cancer (42).

Other Lymphocyte-Based Assays

As lymphocytes are a convenient model for radiation response, several other lymphocyte-based assays have been used to assess individual radiosensitivity. Of these, the most common is the γ -H2AX residual foci assay. H2AX is a protein phosphorylated upon double-strand breaks formation and is one of the earliest events that can be detected after cell irradiation. The number of γ -H2AX foci after cell damage has been extensively used to evaluate response to chemotherapy and RT (43–45). However, the association between the number of residual foci and clinical response to radiation on the patient level (either measured by toxicity or tumor response) has failed to be prospectively validated.

G2 metaphase and G0 micronuclei assays were initially used to assess chromosomal radiosensitivity and predisposition to breast cancer. Along with the γ -H2AX assay, many studies have sought to find an association between G2 metaphase and G0 micronuclei assays and radiation-induced toxicity (46). However, the G2 metaphase assay has exhibited low reproducibility. As new techniques have improved this assay, its use warrants prospective validation (47, 48). Similarly, the G0 micronuclei assay has been compared to other lymphocyte-based assays, but failed to be prospectively validated for prediction of either early or late radiation-associated toxicity (49–51).

Table 2 rates these tests according to their respective level of evidence, based on the STROGAR items and adapted from the levels of evidence proposed by Simon et al. (19).

TABLE 2 | Available assays for radiosensitivity assessment with their respective level of evidence adapted from Simon et al. (19).

Assay	Available studies	Level of evidence
rs17599026 and rs7720298 SNPs for prostate cancer	Meta-analysis for radiation-induced toxicity (26)	I
SNPs for breast cancer	Observational studies (28, 29)	II
SNPs for lung cancer	Observational studies (31, 32)	
RILA	Prospective multicenter study for breast cancer (40)	I
Fibroblast-based assay	Retrospective studies only (34)	IV
G2 metaphase	Retrospective studies only (47, 48)	IV
G0 micronuclei	Retrospective studies only (50)	IV
Residual γ -H2AX foci	No validation studies available (45)	IV

SNP, single nucleotide polymorphism; RILA, radiation-induced lymphocyte apoptosis. Level of evidence based on REMARK guidelines (19).

CLINICAL IMPLEMENTATION

For a radiosensitivity test to have utility in the clinic, a valid alternative treatment option that permits modification of the proposed treatment based on the results of a test must be available. These interventions could be dose or fractionation alterations, addition or omission of concomitant treatments (such as chemotherapy or RT mitigators), or complete exclusion of RT in hypersensitive patients if the predicted risk of toxicity exceeds the expected benefit of RT. For these individuals, treatment with either surgery and/or chemotherapy may be considered. Overall, these interventions can be divided into four situations, based on a patient's tumor control probability (TCP) and NTCP.

High TCP, Low NTCP

A low risk of tumor recurrence and a low risk of radiation-induced toxicity are the ideal clinical presentation. In this situation, quality of life improvement during radiation treatment should be the main goal of any intervention.

There is no need to increase total tumor dose since local control is high with standard treatment. However, alternate fractionation, such as hypofractionation, could offer a shorter treatment course with a substantial increase in quality of life. Hypofractionation has been shown to be a valid alternative for early breast cancer radiation, with schedules decreasing from 33 to 15–16 and finally 5 fractions yielding similar results in well-selected patients (52–54). In this case, hypofractionation could cut the treatment duration by half and have a significant impact on quality of life and treatment cost (55). Furthermore, a combined analysis of the START trials for breast cancer suggests that overall treatment time might be a significant determinant of local cancer control after adjuvant whole breast RT with a lower relapse rate in the accelerated arms (56).

Similarly, several hypofractionated schedules have shown promising results in prostate cancer (most recently the CHHiP and HYPRO trials), with only moderate increase in rectal toxicities (57, 58). Furthermore, when analyzed from a medico-economic point of view, hypofractionated regimens could result in improved health gains at lower cost (59).

High TCP, High NTCP

In this case, the patient would be at increased risk for developing severe toxicity following RT, but at a low risk of tumor recurrence.

This scenario is when alternate treatment plans may be most appropriate, such as a strictly surgical treatment. For example, in low-risk prostate cancer, treatment with either surgery or RT, or even active surveillance in appropriately selected patients has demonstrated similar survival outcomes (60). However, toxicity profiles differ significantly; there is a higher risk for urinary toxicity and erectile dysfunction after surgery, but a greater incidence of rectal bleeding and fecal incontinence after RT (61). Therefore, these treatment options could be offered to the patient, who could take all of these factors into careful consideration when deciding upon the type of treatment. In addition, focal therapies could be considered for appropriately selected patients.

In the case of postoperative prostate cancer, adjuvant RT has been shown to reduce the risk of biochemical failure but without overall survival improvement (62). Thus, in highly radiosensitive patients, RT could be postponed until disease recurrence or omitted altogether.

Considering early breast cancer, postoperative RT has been shown to decrease the risk of local recurrence by 15% (63). However, mastectomy with immediate reconstructive surgery could be an alternative to breast-conserving surgery plus RT for patients at high risk for development of radiation-induced toxicity (64, 65). Of course, in this case, as in any treatment change, patient's opinion should be taken into account in the decision-making process, as a more invasive surgery might be proposed.

Alternatively, in low risk breast cancer and elderly patients, cosmetic results could be improved by reducing radiation treatment volumes with intraoperative RT or partial breast irradiation (66, 67), while maintaining excellent tumor control (68, 69).

Low TCP, Low NTCP

Increasing total treatment dose would be the easiest intervention for a high risk of tumor recurrence in a patient with low risk of radiation-induced toxicity.

Dose escalation has been shown to improve local control in several tumor types, such as prostate or rectal cancer, where an increase in total dose could yield a higher rate of pathological complete response after surgery (70). Several dose escalation trials (in prostate, rectum, cervix or lung cancer for example) are currently recruiting, and these patients could be ideal candidates for radiogenomic trials.

Alternatively, chemotherapy or radiosensitizers could be used to increase radiation efficacy without increasing the physical dose or overall treatment time. In head and neck cancers, for example, the hypoxic modifier nimorazole could be added to the treatment regimen to overcome tumor hypoxia in patients with low risk of radiation-induced toxicity (71, 72). Gemcitabine use in locally advanced bladder cancers also has radiosensitizer effects (73).

Low TCP, High NTCP

This presentation is the worst-case scenario with a highly radiosensitive patient and a high risk of tumor recurrence or progression.

Since the main goal of RT is to ensure tumor control, dose deescalation cannot be offered to these patients since the need for tumor control exceeds the risk of radiation-induced toxicity.

In this case, alternate fractionation could be considered, such as a hyperfractionated regimen, which may maintain the same therapeutic ratio with decreased risk of toxicity (74). When available, stereotactic body radiation therapy could also offer a decreased risk of normal tissue complications with excellent tumor control rates (75). The use of proton or carbon ion RT could also be considered if these modalities are available. Prediction models including clinical and dosimetric parameters are currently under development (76). Individual radiosensitivity measured using the aforementioned tests should be incorporated into these predictive models (77).

When alternate fractionation schedules are not applicable, radioprotectors may reduce the risk of normal tissue toxicity while maintaining comparable tumor control rates (78). Amifostine is the only Federal Drug Administration (FDA)-approved radioprotector (79). However, severe side effects (nausea, hypotension) limit its widespread clinical use. However, patients predicted to be high risk for development of adverse outcomes following RT

could be good candidates for this treatment, whose pharmacologic side effects might prove more easily manageable than severe radiation-induced toxicity.

Table 3 summarizes the different clinical situations stratified by type of cancer and the suggested interventions.

STUDY DESIGN AND MEDICO-ECONOMIC CONSIDERATIONS

Randomized prospective clinical trials are the gold standard for interventional studies (19). There are 10 theoretical possible designs for testing clinical utility of radiogenomics models (80). However, of these, four are most applicable to randomized trials: randomize-all, interaction or risk factor-stratified design, targeted or selection design, and the individual profile design (81).

Randomize-all is the simplest design, with patients randomized for both treatments, regardless of their prognostic group and those being studied subsequently in each treatment arm. It is the most robust design to assess an intervention, regardless of patient profile. The risk factor-stratified design enables hierarchical

TABLE 3 | Suggested treatment adaptations based on TCP and NTCP.

Cancer type	Suggested treatment adaptations			
	High NTCP	High NTCP	Low NTCP	Low NTCP
	Low TCP	High TCP	Low TCP	High TCP
Breast	- Consider the risk of recurrence first - If possible, discussion of a mastectomy ± reconstructive surgery without adjuvant RT	- Consider no adjuvant RT if elderly - Limit large RT fields (consider partial breast RT or IORT)	- Increase treatment fields (IMC, axilla) - Consider hypofractionation	- Consider no adjuvant RT or IORT if elderly - Consider hypofractionation and accelerated RT ± partial breast RT or IORT
Prostate	- Discuss possibility of surgery - RT with rectal spacer - RT with transponders - Discuss indication of pelvic RT - Discuss interest of proton therapy	- Active surveillance - Focal therapy - Brachytherapy - RT with rectal spacer - RT with transponders with reduced margins	- Dose escalation (boost brachytherapy if indicated) - Pelvic RT if indicated	- Active surveillance - Hypofractionation - SBRT
Lung	- Surgery if possible - Discuss hyperfractionation if large volumes	- Surgery - Very limited SBRT in case of non-operable lesions	- Dose escalation - Increase nodal volume (ENI) if indicated	SBRT
Rectum	- Consider the risk of recurrence first - Reduce the volume of fields if possible discuss interest of proton therapy	- Involved field RT - Discuss the need of RT	Dose escalation if boost indicated	- Involved field RT - Contact therapy
Esophagus				
Head and neck	- Consider the risk of recurrence first - Reduce the volume of fields if possible discuss interest of proton therapy	Involved field RT	- Dose escalation - Discuss the use of radiosensitizers (e.g., nimorazole)	- Involved field RT - Hypofractionation
Gynecological tumors	- Consider the risk of recurrence first - Reduce the volume of fields if possible discuss interest of proton therapy	- Involved field RT - No adjuvant RT in adjuvant setting	Dose escalation	- Involved field RT - Hypofractionation
CNS	- Consider the risk of recurrence first - Proton therapy is mandatory	- Involved field RT - No adjuvant RT	Dose escalation	- Involved field RT - Hypofractionation - SBRT

TCP, tumor control probability; NTCP, normal tissue complication probability; IORT, intraoperative radiotherapy; RT, radiotherapy; IMC, internal mammary chain; SBRT, stereotactic body radiation therapy; ENI, elective nodal irradiation; CNS, central nervous system.

statistical tests, by stratifying patients according to their risk level before intervention. In the targeted design, only subjects identified as high-risk patients are randomized for intervention. This model allows studies to target a specific population with a higher statistical power, even if the accuracy of the model is low. Finally, the individual profile design enables parallel therapeutic strategies to be tested in various patient profiles with patients randomized between standard treatment and a risk profile-based strategy (81).

Nevertheless, trials of radiogenomics models should carefully follow appropriate reporting guidelines, such as STROGAR, CONSORT and REMARK in order to make large-scale validation of the results easier (18, 21, 82). Development of these tests for clinical implementation should theoretically follow region-specific guidelines, such as FDA or European Medicines Agency (16). However, not all tests can comply with every item in these guidelines, such as availability of randomized interventional studies. We consider retrospective and large prospective multicenter cohorts to be a required minimum in these cases.

As normal tissue response to radiation is a polygenic trait also affected by clinical, demographic and health behavior factors, multiparametric models should be the gold standard for predictive assays. Furthermore, given that radiosensitivity assays are predictive factors, they cannot be interpreted in an independent manner (83). For example, the RILA assay has been shown to be biased by numerous factors in breast fibrosis prediction, such as smoking habits or hormone therapy (41). A nomogram has thus been developed to incorporate effect modifiers and confounding parameters when predicting risk of radiation-induced breast fibrosis. Similar considerations apply to SNP-based predictive assays. For example, the SNP tagging the TANC1 risk locus for late toxicity in prostate cancer was shown to interact with radiation dose (25). There are likely other gene-by-environment interactions that remain to be uncovered, and inclusion of interaction terms is expected to improve performance of predictive models.

From a health-economic perspective, identification of hypersensitive patients could significantly decrease the cost of radiation-associated toxicity treatments, or even the cost of treatment in low NTCP high TCP patients eligible for accelerated regimens. There are approximately 15.5 million cancer survivors in the US, and there may be substantial costs to clinically manage the toxicities that could result from treatment of their disease (84). Cardiac complications that can develop after RT to the chest area (in breast cancer or lung cancer), for example, can be substantial. Costs associated with adverse outcomes following RT are often hard to specify, because they represent a small part of a complex disease management protocol (85). However, decreasing the rate of late toxicities will undeniably lower long-term costs of cancer survivorship.

In order to clearly quantify the economic gain from radiogenomics tests, several factors need to be considered. First, the cost of the actual test needs to be taken into account. For instance, the costs of the RILA assay or targeted SNP genotyping or gene sequencing for a limited panel are generally less than 2,000€, and the price for clinical whole genome sequencing continues to drop. Treatment costs must also be considered. In this case, treatment

adaptation to the NTCP of the patient could result in significant savings: total health-care expenditures for breast cancer can be decreased by 10% with hypofractionated RT (86). The cost-utility of intervention must be assessed by comparing these costs to Quality-Assessed Life Years, in all patient groups.

Once a test has shown sufficient clinical validity, it can be used to create medical companies, such as Novagray® for the RILA assay, to promote and market the test.

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

A large number of tests for radiosensitivity have been investigated over the last three decades, and some have proven their validity in multicenter prospective settings. Of the many tests developed over the years, only several SNP assays and the RILA assay have shown replicated performance in the development phase.

The next step that should be undertaken is the large-scale study of these models to implement clinical use and assess cost-utility. This is being carried out in Europe through the ongoing REQUITE project, using the RILA assay, as well as other validated biomarkers (42). The RILA assay incorporated in a nomogram with the other independent factors has already proven its validity in a multicenter study on breast cancer and is currently under evaluation for other cancer types (40).

Similarly, the Radiogenomics Consortium has developed the TAILORED project to validate the concept of stratification to identify cancer patients with increased individual radiosensitivity and provide cost-effective therapeutic interventions to reduce the side effects of RT for cancer. This would allow for a personalized risk-adapted approach to provide more effective treatments.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

DA participated in the design of the trial, wrote the manuscript, and coordinated the corrections of all the consortium participants. AL participated in the design of the trial, wrote the manuscript, and coordinated the corrections of all the consortium participants. SG, DD, JC, PL, MB, TW, SB, HT, TR, CT, AV, SK, CA, JC-C, CW, CG, and BR participated in writing the manuscript.

FUNDING

This project has received funding from the European Union's Seventh Framework Programme for research, technological development and demonstration under grant agreement no 601826 (REQUITE). This study was also supported by the SIRIC Montpellier Cancer (Grant INCa-DGOS-Inserm 6045), grants, and contracts to BSR from the United States National Institutes of Health (1R01CA134444 and HHSN261201500043C), the American Cancer Society (RSGT-05-200-01-CCE), the United States Department of Defense (PC074201 and PC140371), K07CA187546 from the United States National Institutes of Health (SLK), Associazione Italiana Ricerca sul Cancro (AIRC-IG16087), grants to AV from Instituto de Salud Carlos III (FIS PI13/02030 and PI16/00046), and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER 2007-2013).

REFERENCES

- Emami B, Lyman J, Brown A, Cola L, Goitein M, Munzenrider JE, et al. Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (1991) 21:109–22. doi:10.1016/0360-3016(91)90171-Y
- Bentzen SM, Constine LS, Deasy JO, Eisbruch A, Jackson A, Marks LB, et al. Quantitative analyses of normal tissue effects in the clinic (QUANTEC): an introduction to the scientific issues. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (2010) 76:S3–9. doi:10.1016/j.ijrobp.2009.09.040
- Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* (2012) 62:220–41. doi:10.3322/caac.21149
- Holthausen H. Erfahrungen über die verträglichkeitsgrenze für röntgenstrahlen und deren nutzenanwendung zur verhütung von schäden. *Strahlentherapie* (1936) 57:254–69.
- Burnet NG, Johansen J, Turesson I, Nyman J, Peacock JH. Describing patients' normal tissue reactions: concerning the possibility of individualising radiotherapy dose prescriptions based on potential predictive assays of normal tissue radiosensitivity. *Int J Cancer* (1998) 79:606–13. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19981218)79:6<606::AID-IJC9>3.0.CO;2-Y
- Barnett GC, West CML, Dunning AM, Elliott RM, Coles CE, Pharoah PDP, et al. Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. *Nat Rev Cancer* (2009) 9:134. doi:10.1038/nrc2587
- Andreassen CN, Alsner J, Overgaard J. Does variability in normal tissue reactions after radiotherapy have a genetic basis – where and how to look for it? *Radiother Oncol* (2002) 64:131–40. doi:10.1016/S0167-8140(02)00154-8
- Bentzen SM, Overgaard M. Relationship between early and late normal-tissue injury after postmastectomy radiotherapy. *Radiother Oncol* (1991) 20:159–65. doi:10.1016/0167-8140(91)90092-U
- Burnet NG, Elliott RM, Dunning A, West CML. Radiosensitivity, radiogenomics and raper. *Clin Oncol* (2006) 18:525–8. doi:10.1016/j.clon.2006.05.007
- Simon R. Roadmap for developing and validating therapeutically relevant genomic classifiers. *J Clin Oncol* (2005) 23:7332–41. doi:10.1200/JCO.2005.02.8712
- Kerns SL, Ostrer H, Rosenstein BS. Radiogenomics: using genetics to identify cancer patients at risk for development of adverse effects following radiotherapy. *Cancer Discov* (2014) 4:155–65. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0197
- Kerns SL, West CML, Andreassen CN, Barnett GC, Bentzen SM, Burnet NG, et al. Radiogenomics: the search for genetic predictors of radiotherapy response. *Future Oncol* (2014) 10:2391–406. doi:10.2217/fon.14.173
- Lilla C, Ambrosone CB, Kropp S, Helmbold I, Schmezer P, von Fournier D, et al. Predictive factors for late normal tissue complications following radiotherapy for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* (2007) 106:143–50. doi:10.1007/s10549-006-9480-9
- Solanki AA, Liauw SL. Tobacco use and external beam radiation therapy for prostate cancer: influence on biochemical control and late toxicity. *Cancer* (2013) 119:2807–14. doi:10.1002/cncr.28128
- Lin A, Abu-Isa E, Griffith KA, Ben-Josef E. Toxicity of radiotherapy in patients with collagen vascular disease. *Cancer* (2008) 113:648–53. doi:10.1002/cncr.23591
- Committee on the Review of Omics-Based Tests for Predicting Patient Outcomes in Clinical Trials, Board on Health Care Services, Board on Health Sciences Policy, Institute of Medicine. In: Michiel CM, Nass SJ, Omenn GS, editors. *Evolution of Translational Omics: Lessons Learned and the Path Forward*. Washington, DC: National Academies Press (US) (2012). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK202168/>
- Hayes DF, Bast RC, Desch CE, Fritzsche H, Kemeny NE, Jessup JM, et al. Tumor marker utility grading system: a framework to evaluate clinical utility of tumor markers. *J Natl Cancer Inst* (1996) 88:1456–66. doi:10.1093/jnci/88.20.1456
- McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. Diagnostics for the SS of the N-EWG on C. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK). *J Natl Cancer Inst* (2005) 97:1180–4. doi:10.1093/jnci/dji237
- Simon RM, Paik S, Hayes DF. Use of archived specimens in evaluation of prognostic and predictive biomarkers. *J Natl Cancer Inst* (2009) 101:1446–52. doi:10.1093/jnci/djp335
- Altman DG, McShane LM, Sauerbrei W, Taube SE. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK): explanation and elaboration. *PLoS Med* (2012) 9(5):e1001216. doi:10.1371/journal.pmed.1001216
- Kerns SL, de Ruyscher D, Andreassen CN, Azria D, Barnett GC, Chang-Claude J, et al. STROGAR – Strengthening the reporting of genetic association studies in radiogenomics. *Radiother Oncol* (2014) 110:182–8. doi:10.1016/j.radonc.2013.07.011
- Dancey JE, Dobbin KK, Groshen S, Jessup JM, Hruszkewycz AH, Koehler M, et al. Guidelines for the development and incorporation of biomarker studies in early clinical trials of novel agents. *Clin Cancer Res* (2010) 16:1745–55. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2167
- Kerns SL, Ostrer H, Stock R, Li W, Moore J, Pearlman A, et al. Genome-wide association study to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with the development of erectile dysfunction in African-American men after radiotherapy for prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (2010) 78:1292–300. doi:10.1016/j.ijrobp.2010.07.036
- Barnett GC, West CML, Coles CE, Pharoah PDP, Talbot CJ, Elliott RM, et al. Standardized total average toxicity score: a scale- and grade-independent measure of late radiotherapy toxicity to facilitate pooling of data from different studies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (2012) 82:1065–74. doi:10.1016/j.ijrobp.2011.03.015
- Fachal L, Gómez-Caamaño A, Barnett GC, Peleteiro P, Carballo AM, Calvo-Crespo P, et al. A three-stage genome-wide association study identifies a susceptibility locus for late radiotherapy toxicity at 2q24.1. *Nat Genet* (2014) 46:891–4. doi:10.1038/ng.3020
- Kerns SL, Dorling L, Fachal L, Bentzen S, Pharoah PDP, Barnes DR, et al. Meta-analysis of genome wide association studies identifies genetic markers of late toxicity following radiotherapy for prostate cancer. *EBioMedicine* (2016) 10:150–63. doi:10.1016/j.ebiom.2016.07.022
- Andreassen CN, Rosenstein BS, Kerns SL, Ostrer H, De Ruyscher D, Cesaretti JA, et al. Individual patient data meta-analysis shows a significant association between the ATM rs1801516 SNP and toxicity after radiotherapy in 5456 breast and prostate cancer patients. *Radiother Oncol* (2016) 121(3):431–9. doi:10.1016/j.radonc.2016.06.017
- Talbot CJ, Tanteles GA, Barnett GC, Burnet NG, Chang-Claude J, Coles CE, et al. A replicated association between polymorphisms near TNF α and risk for adverse reactions to radiotherapy. *Br J Cancer* (2012) 107:748–53. doi:10.1038/bjc.2012.290
- Edvardsen H, Landmark-Høyvik H, Reinertsen KV, Zhao X, Grenaker-Alnaes GI, Nebdal D, et al. SNP in TXNRD2 associated with radiation-induced fibrosis: a study of genetic variation in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (2013) 86:791–9. doi:10.1016/j.ijrobp.2013.02.025
- Seibold P, Behrens S, Schmezer P, Helmbold I, Barnett G, Coles C, et al. XRCC1 polymorphism associated with late toxicity after radiation therapy in breast cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (2015) 92:1084–92. doi:10.1016/j.ijrobp.2015.04.011
- Pang Q, Wei Q, Xu T, Yuan X, Lopez Guerra JL, Levy LB, et al. Functional promoter variant rs2868371 of HSPB1 is associated with risk of radiation pneumonitis after chemoradiation for non-small cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (2013) 85:1332–9. doi:10.1016/j.ijrobp.2012.10.011
- Guerra JLL, Gomez D, Wei Q, Liu Z, Wang L-E, Yuan X, et al. Association between single nucleotide polymorphisms of the transforming growth factor β 1 gene and the risk of severe radiation esophagitis in patients with lung cancer. *Radiother Oncol* (2012) 105:299–304. doi:10.1016/j.radonc.2012.08.014
- Burnet NG, Wurm R, Yarnold JR, Peacock JH, Nyman J, Turesson I. Prediction of normal-tissue tolerance to radiotherapy from in-vitro cellular radiation sensitivity. *Lancet* (1992) 339:1570–1. doi:10.1016/0140-6736(92)91833-T
- Gera FB, Peters LJ, Kian Ang K, Wike JL, Brock WA. Prospective comparison of in vitro normal cell radiosensitivity and normal tissue reactions in radiotherapy patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (1993) 27:1173–9. doi:10.1016/0360-3016(93)90540-C
- Peacock J, Ashton A, Bliss J, Bush C, Eady J, Jackson C, et al. Cellular radiosensitivity and complication risk after curative radiotherapy. *Radiother Oncol* (2000) 55:173–8. doi:10.1016/S0167-8140(00)00173-0
- Somaiah N, Chua MLK, Bourne S, Daley F, A' Hern R, Nuta O, et al. Correlation between DNA damage responses of skin to a test dose of radiation

- and late adverse effects of earlier breast radiotherapy. *Radiother Oncol* (2016) 119:244–9. doi:10.1016/j.radonc.2016.04.012
37. West CM, Davidson SE, Elyan SA, Valentine H, Roberts SA, Swindell R, et al. Lymphocyte radiosensitivity is a significant prognostic factor for morbidity in carcinoma of the cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (2001) 51:10–5. doi:10.1016/S0360-3016(01)01575-9
 38. Ozsahin M, Ozsahin H, Shi Y, Larsson B, Würdinger FE, Crompton NE. Rapid assay of intrinsic radiosensitivity based on apoptosis in human CD4 and CD8 T-lymphocytes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (1997) 38:429–40. doi:10.1016/S0360-3016(97)00038-2
 39. Mirjole C, Merlin JL, Dalban C, Maingon P, Azria D. Correlation between radio-induced lymphocyte apoptosis measurements obtained from two French centres. *Cancer Radiother* (2016) 20:391–4. doi:10.1016/j.canrad.2016.03.007
 40. Azria D, Riou O, Castan F, Nguyen TD, Peignaux K, Lemanski C, et al. Radiation-induced CD8 T-lymphocyte apoptosis as a predictor of breast fibrosis after radiotherapy: results of the prospective multicenter french trial. *EBioMedicine* (2015) 2:1965–73. doi:10.1016/j.ebiom.2015.10.024
 41. Brengues M, Lapiere A, Bourcier C, Pelegrin A, Özşahin M, Azria D. T lymphocytes to predict radiation-induced late effects in normal tissues. *Expert Rev Mol Diagn* (2017) 17(2):119–27. doi:10.1080/14737159.2017.1271715
 42. West C, Azria D, Chang-Claude J, Davidson S, Lambin P, Rosenstein B, et al. The REQUITE project: validating predictive models and biomarkers of radiotherapy toxicity to reduce side-effects and improve quality of life in cancer survivors. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* (2014) 26:739–42. doi:10.1016/j.clon.2014.09.008
 43. Olive PL, Banath JP, Keyes M. Residual γ H2AX after irradiation of human lymphocytes and monocytes in vitro and its relation to late effects after prostate brachytherapy. *Radiother Oncol* (2008) 86:336–46. doi:10.1016/j.radonc.2007.09.002
 44. Ivashkevich A, Redon CE, Nakamura AJ, Martin RF, Martin OA. Use of the γ -H2AX assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research. *Cancer Lett* (2012) 327:123–33. doi:10.1016/j.canlet.2011.12.025
 45. Pinkawa M, Brzozowska K, Kriehuber R, Eble MJ, Schmitz S. Prediction of radiation-induced toxicity by in vitro radiosensitivity of lymphocytes in prostate cancer patients. *Future Oncol* (2016) 12:617–24. doi:10.2217/fon.15.334
 46. Dorling L, Barnett GC, Michailidou K, Coles CE, Burnet NG, Yarnold J, et al. Patients with a high polygenic risk of breast cancer do not have an increased risk of radiotherapy toxicity. *Clin Cancer Res* (2016) 22:1413–20. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-1080
 47. Hoeller U, Borgmann K, Bonacker M, Kuhlmeier A, Bajrovic A, Jung H, et al. Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may be used to predict the risk of fibrosis after radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol* (2003) 69:137–44. doi:10.1016/j.radonc.2003.10.001
 48. Terzoudi GI, Hatz V, Barszczewska K, Manola KN, Stavropoulou C, Angelakis P, et al. G2-checkpoint abrogation in irradiated lymphocytes: a new cytogenetic approach to assess individual radiosensitivity and predisposition to cancer. *Int J Oncol* (2009) 35:1223–30. doi:10.3892/ijo-00000439
 49. Scott D, Barber JB, Spreadborough AR, Burrill W, Roberts SA. Increased chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: a comparison of two assays. *Int J Radiat Biol* (1999) 75:1–10. doi:10.1080/095530099140744
 50. Barber JBP, Burrill W, Spreadborough AR, Levine E, Warren C, Kiltie AE, et al. Relationship between in vitro chromosomal radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes and the expression of normal tissue damage following radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol* (2000) 55:179–86. doi:10.1016/S0167-8140(99)00158-9
 51. Padjas A, Kedzierawski P, Florek A, Kułowiec P, Kuszewski T, Góźdz S, et al. Comparative analysis of three functional predictive assays in lymphocytes of patients with breast and gynaecological cancer treated by radiotherapy. *J Contemp Brachytherapy* (2012) 4:219–26. doi:10.5114/jcb.2012.32556
 52. FAST Trialists group, Agrawal RK, Alhasso A, Barrett-Lee PJ, Bliss JM, Bliss P, et al. First results of the randomised UK FAST Trial of radiotherapy hypofractionation for treatment of early breast cancer (CRUKE/04/015). *Radiother Oncol* (2011) 100:93–100. doi:10.1016/j.radonc.2011.06.026
 53. Fisher CM, Rabinovitch R. Frontiers in radiotherapy for early-stage invasive breast cancer. *J Clin Oncol* (2014) 32:2894–901. doi:10.1200/JCO.2014.55.1184
 54. Zhou Z-R, Mei X, Chen X-X, Yang Z-Z, Hou J, Zhang L, et al. Systematic review and meta-analysis comparing hypofractionated with conventional fraction radiotherapy in treatment of early breast cancer. *Surg Oncol* (2015) 24:200–11. doi:10.1016/j.suronc.2015.06.005
 55. Min C, Connolly E, Chen T, Jozsef G, Formenti SC. Hypofractionated radiation therapy for early stage breast cancer: outcomes, toxicities, and cost analysis. *Breast J* (2014) 20:267–73. doi:10.1111/tbj.12254
 56. Haviland JS, Bentzen SM, Bliss JM, Yarnold JR; START Trial Management Group. Prolongation of overall treatment time as a cause of treatment failure in early breast cancer: an analysis of the UK START (Standardisation of Breast Radiotherapy) trials of radiotherapy fractionation. *Radiother Oncol* (2016) 121:420–3. doi:10.1016/j.radonc.2016.08.027
 57. Aluwini S, Pos F, Schimmel E, van Lin E, Krol S, van der Toorn PP, et al. Hypofractionated versus conventionally fractionated radiotherapy for patients with prostate cancer (HYPRO): acute toxicity results from a randomised non-inferiority phase 3 trial. *Lancet Oncol* (2015) 16:274–83. doi:10.1016/S1473-2045(14)70482-6
 58. Dearnaley D, Syndikus I, Mossop H, Khoo V, Birtle A, Bloomfield D, et al. Conventional versus hypofractionated high-dose intensity-modulated radiotherapy for prostate cancer: 5-year outcomes of the randomised, non-inferiority, phase 3 CHHiP trial. *Lancet Oncol* (2016) 17(8):1047–60. doi:10.1016/S1473-2045(16)30102-4
 59. Zemlányi AT, Kaló Z, Kovács G, Farkas R, Beöthe T, Bányai D, et al. Cost-effectiveness analysis of intensity-modulated radiation therapy with normal and hypofractionated schemes for the treatment of localised prostate cancer. *Eur J Cancer Care (Engl)* (2016). doi:10.1111/ecc.12430
 60. Hamdy FC, Donovan JL, Lane JA, Mason M, Metcalfe C, Holding P, et al. 10-year outcomes after monitoring, surgery, or radiotherapy for prostate cancer. *N Engl J Med* (2016) 375:1415–24. doi:10.1056/NEJMoa1606220
 61. Donovan JL, Hamdy FC, Lane JA, Mason M, Metcalfe C, Walsh E, et al. Patient-reported outcomes after monitoring, surgery, or radiotherapy for prostate cancer. *N Engl J Med* (2016) 375:1425–37. doi:10.1056/NEJMoa1606221
 62. Bolla M, van Poppel H, Tombal B, Vekemans K, Da Pozzo L, de Reijke TM, et al. Postoperative radiotherapy after radical prostatectomy for high-risk prostate cancer: long-term results of a randomised controlled trial (EORTC trial 22911). *Lancet* (2012) 380:2018–27. doi:10.1016/S0140-6736(12)61253-7
 63. EBCTCG. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10 801 women in 17 randomised trials. *Lancet* (2011) 378:1707–16. doi:10.1016/S0140-6736(11)61629-2
 64. Clarke M, Collins R, Darby S, Davies C, Elphinstone P, Evans V, et al. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* (2005) 366:2087–106. doi:10.1016/S0140-6736(05)67887-7
 65. Litière S, Werutsky G, Fentiman IS, Rutgers E, Christiaens M-R, Van Limbergen E, et al. Breast conserving therapy versus mastectomy for stage I–II breast cancer: 20 year follow-up of the EORTC 10801 phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol* (2012) 13:412–9. doi:10.1016/S1473-2045(12)70042-6
 66. Lemanski C, Azria D, Gourgou-Bourgade S, Ailleres N, Pastant A, Rouanet P, et al. Electrons for intraoperative radiotherapy in selected breast-cancer patients: late results of the Montpellier phase II trial. *Radiat Oncol* (2013) 8:191. doi:10.1186/1748-717X-8-191
 67. Keshtgar MRS, Williams NR, Bulsara M, Saunders C, Flyer H, Cardoso JS, et al. Objective assessment of cosmetic outcome after targeted intraoperative radiotherapy in breast cancer: results from a randomised controlled trial. *Breast Cancer Res Treat* (2013) 140:519–25. doi:10.1007/s10549-013-2641-8
 68. Veronesi U, Orecchia R, Maisonneuve P, Viale G, Rotmensz N, Sangalli C, et al. Intraoperative radiotherapy versus external radiotherapy for early breast cancer (ELIOT): a randomised controlled equivalence trial. *Lancet Oncol* (2013) 14:1269–77. doi:10.1016/S1473-2045(13)70497-2
 69. Vaidya JS, Wenz F, Bulsara M, Tobias JS, Joseph DJ, Keshtgar M, et al. Risk-adapted targeted intraoperative radiotherapy versus whole-breast radiotherapy for breast cancer: 5-year results for local control and overall survival from the TARGIT – a randomised trial. *Lancet* (2014) 383:603–13. doi:10.1016/S0140-6736(13)61950-9
 70. Hall MD, Schultheiss TE, Smith DD, Fakih MG, Wong JYC, Chen Y-J. Effect of increasing radiation dose on pathologic complete response in rectal cancer patients treated with neoadjuvant chemoradiation therapy. *Acta Oncol* (2016) 55:1392–9. doi:10.1080/0284186X.2016.1235797
 71. Henk JM, Bishop K, Shepherd SE. Treatment of head and neck cancer with CHART and nimorazole: phase II study. *Radiother Oncol* (2003) 66:65–70. doi:10.1016/S0167-8140(02)00284-0

72. Bentzen J, Toustrup K, Eriksen JG, Primdahl H, Andersen LJ, Overgaard J. Locally advanced head and neck cancer treated with accelerated radiotherapy, the hypoxic modifier nimorazole and weekly cisplatin. Results from the DAHANCA 18 phase II study. *Acta Oncol* (2015) 54:1001–7. doi:10.3109/0284186X.2014.992547
73. Caffo O, Thompson C, De Santis M, Kragelj B, Hamstra DA, Azria D, et al. Concurrent gemcitabine and radiotherapy for the treatment of muscle-invasive bladder cancer: a pooled individual data analysis of eight phase I-II trials. *Radiother Oncol* (2016) 121:193–8. doi:10.1016/j.radonc.2016.09.006
74. Thames HD, Peters LT, Withers HR, Fletcher GH. Accelerated fractionation vs hyperfractionation: rationales for several treatments per day. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (1983) 9:127–38. doi:10.1016/0360-3016(83)90089-5
75. Milano MT, Constine LS, Okunieff P. Normal tissue toxicity after small field hypofractionated stereotactic body radiation. *Radiat Oncol* (2008) 3:36. doi:10.1186/1748-717X-3-36
76. Langendijk JA, Lambin P, De Ruyscher D, Widder J, Bos M, Verheij M. Selection of patients for radiotherapy with protons aiming at reduction of side effects: the model-based approach. *Radiother Oncol* (2013) 107:267–73. doi:10.1016/j.radonc.2013.05.007
77. Rosenstein BS, West CM, Bentzen SM, Alsner J, Andreassen CN, Azria D, et al. Radiogenomics: radiobiology enters the era of big data and team science. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (2014) 89:709–13. doi:10.1016/j.ijrobp.2014.03.009
78. Kamran MZ, Ranjan A, Kaur N, Sur S, Tandon V. Radioprotective agents: strategies and translational advances. *Med Res Rev* (2016) 36:461–93. doi:10.1002/med.21386
79. Kouvaris JR, Kouloulas VE, Vlahos LJ. Amifostine: the first selective-target and broad-spectrum radioprotector. *Oncologist* (2007) 12:738–47. doi:10.1634/theoncologist.12-6-738
80. Kraft P, Cox DG. Study designs for genome-wide association studies. *Adv Genet* (2008) 60:465–504. doi:10.1016/S0065-2660(07)00417-8
81. De Ruyscher D, Defraene G, Ramaekers BLT, Lambin P, Briers E, Stobart H, et al. Optimal design and patient selection for interventional trials using radiogenomic biomarkers: a REQUITE and radiogenomics consortium statement. *Radiother Oncol* (2016) 121(3):440–6. doi:10.1016/j.radonc.2016.11.003
82. Hopewell S, Clarke M, Moher D, Wager E, Middleton P, Altman DG, et al. CONSORT for reporting randomized controlled trials in journal and conference abstracts: explanation and elaboration. *PLoS Med* (2008) 5:e20. doi:10.1371/journal.pmed.0050020
83. Altman DG, Lausen B, Sauerbrei W, Schumacher M. Dangers of using “Optimal” cutpoints in the evaluation of prognostic factors. *J Natl Cancer Inst* (1994) 86:829–35. doi:10.1093/jnci/86.11.829
84. Rim SH, Guy GP, Yabroff KR, McGraw KA, Ekwueme DU. The impact of chronic conditions on the economic burden of cancer survivorship: a systematic review. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res* (2016) 16:579–89. doi:10.1080/14737167.2016.1239533
85. Yabroff KR, Warren JL, Brown ML. Costs of cancer care in the USA: a descriptive review. *Nat Rev Clin Oncol* (2007) 4:643–56. doi:10.1038/nrnc0978
86. Bekelman JE, Sylwestrzak G, Barron J, Liu J, Epstein AJ, Freedman G, et al. Uptake and costs of hypofractionated vs conventional whole breast irradiation after breast conserving surgery in the United States, 2008–2013. *JAMA* (2014) 312:2542–50. doi:10.1001/jama.2014.16616

Conflict of Interest Statement: DA participated in the NovaGray start-up creation. The other authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Azria, Lapierre, Gourgu, De Ruyscher, Colinge, Lambin, Brengues, Ward, Bentzen, Thierens, Rancati, Talbot, Vega, Kerns, Andreassen, Chang-Claude, West, Gill and Rosenstein. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Résumé : Implication de la paraoxonase 1 dans la réponse des lymphocytes à l'irradiation

Cinquante pourcents des patients suivis pour un cancer reçoivent de la radiothérapie à un moment de leur prise en charge. Contrairement à la chimiothérapie, la radiothérapie est un traitement local donc la dose est prescrite à la tumeur. Cependant, en raison de diverses contraintes techniques, les tissus et les organes environnant reçoivent également des radiations ionisantes, responsables des effets secondaires de ce traitement. Cinq à dix pourcents des patients traités par radiothérapie vont développer des toxicités sévères après leur traitement. L'identification précoce de ces patients est cruciale. En pratique clinique, un test rapide et fiable permettant de déterminer le risque des patients de développer des effets secondaires graves apparaît d'une grande importance. Dans les années 90, Ozsahin et al. ont développé un test rapide et simple pour déterminer la radiosensibilité intrinsèque, basé sur l'évaluation de l'apoptose radio-induite des lymphocytes T CD8+ après irradiation à 8 Gy (test RILA). Ce test a récemment été validé dans des études prospectives multicentriques dans le cancer du sein et de la prostate.

Cependant, à ce jour, les mécanismes moléculaires permettant d'expliquer le fait que les lymphocytes permettent de prédire la réponse des tissus sains restent inconnus. Notre équipe a récemment mis en évidence qu'un facteur sécrété par les lymphocytes pourrait être impliqué dans ce phénomène : la paraoxonase 1 (PON1). Le but de ce projet était donc d'étudier l'implication de PON1 dans la réponse des lymphocytes à l'irradiation.

Nous avons tout d'abord cherché à développer un modèle cellulaire reproductible du test RILA afin de déterminer l'influence de la modulation de PON1 sur les résultats de ce test. Par la suite, nous avons exploré le rôle de PON1 dans la réponse à la radiothérapie des lymphocytes issus de patients. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que PON1 semble impliquée dans des voies de signalisations liées à la réparation de l'ADN après irradiation, bien que son rôle exact reste incertain.

Au total, PON1 apparaît comme un potentiel marqueur de radiosensibilité intrinsèque.

Abstract : Paraoxonase 1 and its role in radiation response of human lymphocytes

Fifty percent of all cancer patients benefit from receiving radiotherapy (RT) as part of their cancer management. Unlike chemotherapy, radiotherapy is a local treatment in which the maximal dose is delivered to the tumor; however, due to technical constraints, surrounding organs and tissues can also be irradiated, leading to side effects. About 5-10% of all patients undergoing RT will develop severe late side effects. Early identification of these patients is critical. In the clinic, a robust and rapid assay to predict the patients' susceptibility to develop late radiation-induced toxicity is undeniably needed. In the late 90s, Ozsahin et al. developed a rapid and simple test for intrinsic radiosensitivity based on the assessment of radiation-induced CD8+T lymphocyte apoptosis (RILA) after 8 Gy irradiation of whole blood. Recently, the RILA assay has been validated in prospective multicenter trials in breast and prostate cancer.

However, as of today the mechanisms explaining how the lymphocytes act as the mirror of healthy tissues are still unclear. Recent findings in our team suggest that a protein secreted by lymphocytes could play a role in this mechanism: paraoxonase 1 (PON1). The main focus of this project was to understand the implication of PON1 in the radiation response of human lymphocytes.

We first attempted to develop a cellular model for the RILA assay and assessed the effect of PON1 modulation in this model. Then, we explored PON1 and its role in radiation response of patients' lymphocytes. We determined that PON1 might be implicated in DNA repair pathways although its definitive role remains uncertain.

Overall, PON1 might be a new biomarker for patient radiosensitivity.

Discipline : Cancérologie

Mots-clés : Radiosensibilité, Traitements du cancer, Radiothérapie

Laboratoire : Immunociblage et Radiobiologie en Oncologie - Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier- Inserm U1194 - Université de Montpellier - ICM- 34298 Montpellier Cedex 5, France